Untersuchungen zur Wechselwirkung der Nucleotidbasen mit dem Enzym bei der Reaktion der Pankreas-Ribonuclease

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rolf Bald
aus Siegen/Westf.

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Untersuchungen zur Wechselwirkung der Nucleotidbasen mit dem Enzym bei der Reaktion der Pankreas-Ribonuclease

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Rolf Bald
aus Siegen/Westf.

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am 25. 6. 1969

Tag der mündlichen Prüfung am 2. 7. 1969
Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. H. Witzel
Mitberichterstatter : Prof. Dr. K. Dimroth

Seite

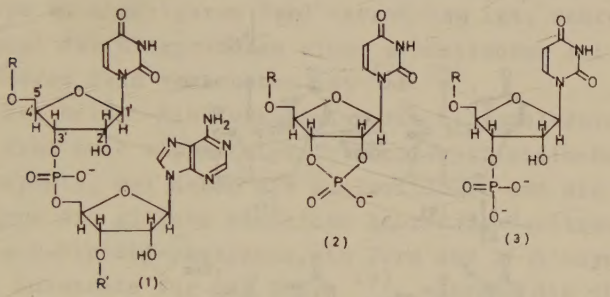
A.) Einleitung und Problemstellung 6
B.) Untersuchungen über die Auswirkung einer Methylgruppe in Nachbarstellung zur Carbonylgruppe einer Nucleotidbase auf die enzymatische Reaktion 1o
a) Beeinflussung der Basizität der Carbonylgruppe 11
b) Beeinflussung der Fixierung der Nucleotidbase 12
c) Synthese und Eigenschaften alkylsubstituierter Nucleoside und Nucleotide 13
I. Methylierung von 8-Oxo-purin-derivaten .. 13
1.) Darstellung der Ausgangsverbindungen. 13
2.) Methylierung von 8-Oxo-guanosin-derivaten 18
2a) Reaktion mit Dimethylsulfat 19
2b) Reaktion mit Diazomethan 21
2c) Reaktion mit N,N-Dimethyl-formamid-dimethyl-acetal 21
2d) Darstellung von N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat 22
2e) Darstellung von N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat 24
2f) Darstellung von N^1-Methyl-8-methoxy-guanosin 27
2g) Reaktion mit Phenylglyoxal 29
3.) Methylierung von 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat 3o
II. Alkylierung und Methylierung von Uridin- und N^3-Harnsäureribosid-derivaten. 33
1.) Darstellung von N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-cyclophosphat 33
2.) Darstellung von N^1,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat. 34
d) Schlussfolgerungen 35
C.) Untersuchungen über die Natur der Wechselwirkung 36

Seite

a) Faktoren, die diese Wechselwirkung beeinflussen können 37
I. Darstellung von Nucleosid-phosphaten, die im Basenteil modifiziert sind 38
1.) Darstellung von 5-Nitro-uridin-2':3'-cyclophosphat 38
2.) Darstellung von N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat 39
3.) Darstellung von N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat 39
4.) Darstellung von 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-2':3'-cyclophosphat 39
II. Nucleosid-phosphate, die im Zuckerteil modifiziert sind 42
III. Differenzspektroskopische Daten 45
b) Ergebnisse der Differenzspektroskopie 53
c) Aussagen aus den Untersuchungen zum Circular-Dichroismus 73
D.) Zusammenfassende Diskussion 86
E.) Experimenteller Teil 88
I. Allgemeine Arbeitsmethodik 88
II. Darstellung der Substanzen 96
F.) Literaturverzeichnis 114

A.) Einleitung und Problemstellung.

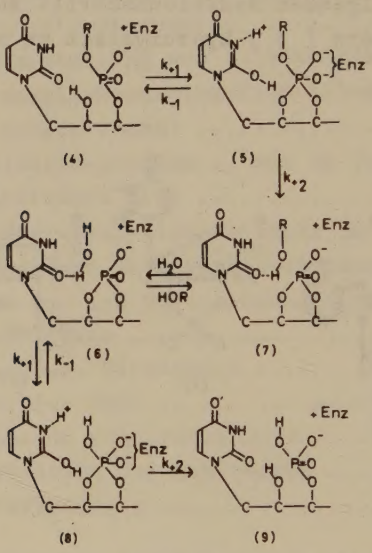
Die Pankreas-Ribonuclease spaltet die Phosphorsäurediesterbindungen (1) von in Ribonucleinsäuren vorkommenden Pyrimidin-nucleosid-phosphaten an der 5'-Diesterbindung [1]. Dabei entstehen zunächst die 2':3'-cyclischen Phosphorsäurediester (2) der Pyrimidin-nucleosid-phosphate, die im folgenden Reaktionsschritt zu den 3'-Phosphorsäuremonoestern (3) hydrolysiert werden [2].



Diese Spezifität für die Pyrimidin-nucleosid-phosphate ist jedoch nicht absolut [3]. Als notwendige Bedingung für die enzymatische Katalyse wurde für den Basenbestandteil der Nucleosid-phosphate ein zur Mesomerie befähigtes, heteroaromatisches Ringsystem gefordert, das in alpha-Stellung zur Glycosidbindung der D-Ribose, also am C-2 der Pyrimidine oder am C-8 der Purine, eine Carbonyl- (oder Thiocarbonyl- [4]) Funktion besitzt [3].

Für die enzymatische Reaktion wurde aufgrund früherer [5] Untersuchungen ein Reaktionsmechanismus formuliert, der wie bei der protonenkatalysierten nichtenzymatischen Hydrolyse über einen Zwischenzustand mit pentakovalentem Phosphor (5) führt. Dieser Zustand wird von dem Enzym durch zwei positiv geladene, protonierende Gruppen stabi-

lisiert. Die Base des Nucleotids mit ihrem C-2-Sauerstoff katalysiert dabei den Angriff der 2'-OH-Gruppe (4) bzw. des Wassermoleküls (6) und damit die Ausbildung des Zwischenzustandes (5 bzw. 8). Der Zerfall dieses Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt dann durch eine Protonenkatalyse, die jetzt von der Nucleotidbase in Form der konjugaten Säure durchgeführt wird.



Nach diesem Reaktionsablauf, bei dem die messbaren kinetischen Konstanten auf definierte Reaktionsschritte zurückgeführt werden können, liegt die Spezifität , entgegen der üblichen Vorstellung [7 - 11], in der Katalyse und nicht in einer spezifiscnen Bindung der Base an das Enzym begründet. Eine solche spezifische Bindung konnte an Hand von modifizierten Substraten ausgeschlossen werden [3].

Verschiedene Beobachtungen zwingen jedoch zu der Annahme, dass eine unspezifische Wechselwirkung von Nucleotidbase und Enzym vorhanden sein muss, die zur Stabilität des Komplexes beiträgt.

1.) Phosphorsäure und Phosphorsäuremonoester, sofern sie

dianionisch vorliegen können, bilden mit dem Enzym einen analogen Komplex wie die Substrate, wenn diese nach der Basenkatalyse in den dianionischen Zwischenzustand übergegangen sind. Hierbei zeigt sich, dass die Mononucleotide wesentlich stärker gebunden werden, als andere Phosphorsäuremonoester [11].

2.) Mononucleosid-phosphate, die stark an das Enzym gebunden werden, zeigen nach der Bindung an das Enzym UV-Absorptionsspektren, die nicht einer einfachen Addition der Absorptionen der Einzelbestandteile entsprechen [12-16].

3.) Das NMR-Spektrum zeigt, dass das Signal des C-6-Protons der Pyrimidin-nucleosid-phosphate im Komplex mit dem Enzym zu niedrigerem Feld verschoben ist, während das Signal der Ringprotonen einer aromatischen Aminosäure nach höherem Feld verschoben ist [17) 18].

4.) Neben beta-D-Ribofuranosyl-pyrimidin-nucleosid-phosphaten sind auch alpha-L-Lyxofuranosyl-pyrimidin-nucleosid-phosphate, bei denen die Nucleotidbase und die Phosphatgruppe die gleiche räumliche Anordnung besitzen wie die beta-D-Ribosid-phosphate, in Form der 2':3'-cyclischen Diester Substrate für das Enzym [19], während die chiralen Enantiomeren keine Substrate sind.

5.) Weitere Anhaltspunkte für eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Enzym und Nucleotidbase lieferten die Untersuchungen zur Kristallstruktur der Ribonuclease A [2o-22]. Hier zeigte sich, dass das kokristallisierte Nucleosid-phosphat mit seiner Base dem aromatischen Kern des Phe 12o nahe steht, eventuell aufliegt, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass noch Wasserstoffbrücken zu anderen polaren Gruppen des Enzyms möglich sind.

Es liess sich weiterhin erkennen, dass die Imidazolgruppe des His 119 und die ϵ-Aminogruppe des Lys 41 die primäre Bindung des Substrates an das Enzym übernehmen, wie sie aus kinetischen-und NMR-spektroskopischen Daten gefordert werden [17].

Unter diesen Umständen erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass der Beitrag der Nucleotidbase zur Bindungsstärke aus der Wechselwirkung zwischen den aromatischen Ringsystemen resultiert. Mit diesen Annahmen könnte dann

auch das Auftreten der Differenzspektren erklärt werden, deren Deutung bisher unbefriedigend [14] und zum Teil widersprüchlich zu experimentellen Beobachtungen stand [23].

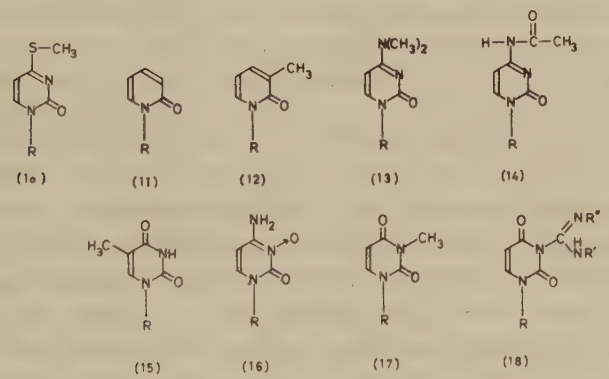
Ein weiteres bisher nicht befriedigend erklärtes Phänomen ist das enzymatische Verhalten von in 3-Stellung substituierten Pyrimidin-nucleosid-phosphaten. So sind N^3-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat [24] und Cytidin-N^3-oxid-2':3'-cyclophosphat [28] keine Substrate. Eine Begründung dieses Verhaltens sollte es ermöglichen, auch die vorher angeschnittenen Probleme zu verstehen. Dabei müsste erwogen werden, ob hier eine Störung der katalytischen Funktion der Base oder eventuell eine Störung der Wechselwirkung zwischen den aromatischen Systemen vorliegt. In diesem Falle sollte die Wechselwirkung der Base in Form einer Fixierung für die enzymatische Reaktion eine unbedingte Voraussetzung sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst zu klären versucht werden, ob die Methylgruppe die katalytische Funktion stören kann, ausgehend von der Vorstellung, dass dabei der Abstand der Methylgruppe vom C-2-Sauerstoff kritisch sein müsste.

Andererseits sollte die Wechselwirkung der Nucleotidbase mit dem Enzym durch Verwendung von substituierten und in der Konformation veränderter Nucleosid-phosphate an Hand der Differenzspektren zu analysieren sein und darüber hinaus sollte eine Aussage über die genaue Lage der Base zum Phe 12o gewonnen werden, die die Untersuchungen an der Kristallstruktur nicht zu liefern vermögen.

B.) Untersuchungen über die Auswirkung einer Methylgruppe in Nachbarstellung zur Carbonylgruppe einer Nucleotidbase auf die enzymatische Reaktion.

N^3-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat [27) 3)] (17a), 3-Methyl-1-(beta-D-ribofuranosyl)-pyridon-(2)-2':3'-cyclophosphat [3)] (12a), Cytidin-N^3-oxid-2':3'-cyclophosphat [25) 26) 28)] (16a) und N^3-(N-Cyclohexyl-N'-morpholinium-methyl-äthyl)-carbamidino-uridin-2':3'-cyclophosphat [29) 3o)] (18a) sind im Gegensatz zu den nichtsubstituierten Derivaten keine Substrate mehr.[3) 24)]. Als Mononucleotid zeigt das N^3-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat (38) eine stark herabgesetzte Hemmung der enzymatischen Reaktion im Vergleich zum nichtmethylierten Uridin-2'(3')-phosphat. Dagegen verändern Methylsubstituenten in 4-Stellung des Pyrimidinringes wie z. B. in N,N-Dimethyl-cytidin- [3)] (13b), 4-Thiomethyl-uridin- [12)] (1ob) und N^4-Acetyl-cytidin-2'(3')-phosphat (14b) [3)] das Verhalten der Verbindungen bei der enzymatischen Hydrolyse nur unwesentlich, d. h., die cyclischen Phosphorsäurediester sind Substrate.



a : R = ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat
b : R = ribofuranosyl-2'(3')-phospnat

5-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat [31)] (15a) ist

ebenso wie das in 6-Stellung durch Carboxylat substituierte Orotidin-2':3'-cyclophosphat [32] (73 aber Cyclophosphat) ein Substrat, während das 6-Methyluridin-2':3'-cyclophosphat [32] (7o aber Cyclophosphat) nicht mehr enzymatisch hydrolysiert wird. Wie im zweiten Teil der Arbeit gezeigt wird, hat das Verhalten des 6-Methyl-derivates eine andere Ursache und es soll deshalb hier nicht weiter in Betracht gezogen werden. Hier soll erst nur der Effekt einer Methylsubstitution in 3-Stellung des Pyrimidinringes betrachtet werden.

Ausgehend von dem in der Einleitung beschriebenen Reaktionsmechanismus kann angenommen werden, dass die Methylgruppe die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes verhindert. Die Bindung an das Enzym erfolgt bei den cyclischen Diestern erst nach der Katalyse durch die Nucleotidbase. Damit eine Basenkatalyse am angreifenden Wassermolekül stattfinden kann, muss einmal die Basizität der Carbonylgruppe ausreichend sein, zum anderen sollte erwartet werden, dass die Häufigkeit des Protonenüberganges nur optimal ist, wenn die Nucleotidbase in der freien Rotation um die glycosidische Bindung eingeschränkt ist oder gar in einer bestimmten Orientierung fixiert ist. Beide Voraussetzungen können durch eine Methylsubstitution beeinflusst werden.

a.) Beeinflussung der Basizität der Carbonylgruppe.

C. A. DEKKER [24] erklärte das Ausbleiben der enzymatischen Hydrolyse bei dem N^3-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat (17 a) mit der Blockierung einer spezifischen Bindungstelle für das Enzym. Diese Deutung konnte jedoch von H. G. GASSEN und H. WITZEL, die zeigen konnten, dass das Pyridon-(2)-ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat (11a) und andere Verbindungen ohne den N^3-Ringstickstoff Substrate sind, ausgeschlossen werden [3]. Ein induktiver Effekt, der die Basizität vermindert, kann beim Cytidin-N^3-oxid-2':3'-cyclophosphat (16a) angenommen werden, nicht aber beim N^3-Methyluridin-2':3'-cyclophosphat (17a).

Am Kalottenmodell der Verbindung (17a) sieht man, dass die Protonen der Methylgruppe sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Orbitalen des freien Elektronenpaares am Carbonylsauerstoff befinden. F. J. F. DIPPY diskutierte eine Wasserstoffbrücke von Methylprotonen zu Carboxylgruppen bei seinen Untersuchungen von Säuredissoziationskonstanten der cis- und trans-Crotonsäure und der o-Tolylcarbonsäure [33]. Später erklärte er die Beeinflussung mit einem sterischen Effekt [34].

Eine Deformation der Orbitale der freien Elektronenpaare der C-2-Carbonylgruppe durch Methylprotonen - der Extremfall wäre eine Wasserstoffbrücke - sollte die Basizität sehr stark beeinflussen, zumal sicher ist, dass für die Katalyse das Proton direkt in das Orbital eines freien Elektronenpaares am Sauerstoff eintreten können muss. Eine solche Beeinflussung, die mit den meisten physikalisch-chemischen Methoden bei Raumtemperatur nicht nachzuweisen ist, könnte sich aber durchaus auf die kinetischen Daten auswirken. Da ein solcher Feldeffekt mit der sechsten Potenz des Abstandes abnimmt [35], sollte eine Methylgruppe, die etwas weiter von einer Carbonylgruppe entfernt ist, keinen Einfluss mehr auf die enzymatische Hydrolyse haben.

Um diese Möglichkeit der Beeinflussung zu überprüfen, sind Verbindungen synthetisiert und untersucht worden, bei denen die Methylgruppe in einem Fünfring in Nachbarstellung zu einer Carbonylgruppe steht. Es handelt sich dabei um in 7-Stellung substituierte 8-Oxo-purinderivate. Der Abstand der beiden Substituenten ist beim Fünfring gegenüber dem beim Sechsring durch eine Winkelaufweitung um ca. 12° grösser geworden.

b.) Beeinflussung der Fixierung der Nucleotidbase.

Aus den in der Einleitung aufgeführten Argumenten lässt sich schliessen, dass die Nucleotidbase von dem Enzym ebenfalls " gebunden " werden muss. Diese Wechselwirkung muss unspezifisch sein, da Substrate bekannt sind, die keine spezifischen " Donor-Acceptor -

Gruppen " mehr besitzen [3]. Die oben aufgeführten Beobachtungen, die zu dem Schlusse führten, dass eine Wechselwirkung bestehen muss, bieten zugleich eine Möglichkeit, bei systematischer Untersuchung von abgeänderten Nucleotiden die Natur und die Voraussetzungen dieser Wechselwirkung zu erkennen. In dieser Arbeit wurde, wie im zweiten Teil ausführlich dargestellt wird, die Methode der Differenzspektroskopie [15] angewandt. Um den Einfluss von Methylsubstituenten auf die Fixierung zu prüfen, wurden auch hier wieder verschiedene alkylierte und methylierte Nucleotide, vor allem aus der 8-Oxo-purin-reihe, untersucht, deren Synthese und physikalisch chemischen Eigenschaften im folgenden Kapitel beschrieben werden.

c.) Synthese und Eigenschaften von alkylsubstituierten Nucleosiden und Nucleotiden.

I.) Methylierung von 8-Oxo-purin-derivaten.

1.) Darstellung der Ausgangsverbindungen.

8-Oxo-guanosin (23b) wurde zuerst von R. E. HOLMES und R. K. ROBINS [36] durch katalytische Hydrierung von 8-Benzyloxy-guanosin dargestellt. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Konformation von Cyclo-anhydronucleosiden wurde diese Verbindung auf einfachere Weise von M. IKEHARA et al.[37] [38] dargestellt. Bei beiden Synthesen ist 8-Brom-guanosin (2ob) die Schlüsselverbindung. Das 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (23a) ist von H. G. GASSEN et al.[3] und M. IKEHARA et al.[38] durch Phosphorylierung des 5'-tritylgeschützten Nucleosids erhalten worden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (22a), ausgehend von Guanosin-2'(3')-phosphat (19c), beschrieben. Gegenüber den oben beschriebenen Verfahren wird hier der Phosphorylierungsschritt gespart. Andererseits stellt diese Methode das Problem, das Nucleotid aus einem grossen Salzüberschuss zu isolieren. Dieses Problem konnte durch Bleisalzfällung der Nucleotide und durch Gelfil-

tration an Sephadex G-lo gelöst werden.

Guanosin-2'(3')-phosphat (19c) wurde mit 1.5 Äquivalenten Brom in Dioxan/Wasser in Acetatpuffer pH 4 bei Raumtemperatur bromiert. Das Reaktionsgemisch wird anschliessend unter Rühren mit einem fünffachen Überschuss an schwach saurer Bleiacetat-lösung versetzt und die entstandene Suspension nach Zusatz von konzentriertem Ammoniak (pH lo - 11) zentrifugierend neutral gewaschen. Bei diesem Vorgang werden Natriumacetat sowie das leichter lösliche Bleibromid von Bleihydroxid und dem schwerlöslichen Bleisalz des 8-Brom-guanosin-2'(3')-phosphates (2oc) entfernt. Die Suspension wird mit verdünnter Essigsäure so stark angesäuert, dass kein kolloidaler Schwefel bei der anschliessenden Sättigung mit Schwefelwasserstoff auftritt. Nach dem Abfiltrieren vom Bleisulfid wird das Filtrat eingeengt und nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs gefriergetrocknet. Das resultierende gelblich gefärbte Rohprodukt enthält nach der Röntgenfluoreszenzanalyse kein Blei mehr und kann für die weitere Synthese ohne besondere Reinigung eingesetzt werden.

Für die Darstellung des 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphates (23c) aus dem 8-Brom-guanosin-2'(3')-phosphat (2o c) wurde die Methode von M. IKEHARA et al.[37] angewandt. Die Einführung des Oxo-Substituenten gelingt nicht durch Hydroxyl-ionen in wässrigem Medium, da durch Deprotonierung am N^1-Stickstoff des Purinringes die Elektrophilie des C-8-Kohlenstoffatoms so weit herabgesetzt wird, dass keine nucleophile Substitution durch Hydroxyl-ionen erfolgen kann.

IKEHARA et al.[37] führten die Umsetzung von 8-Bromguanosin (2ob) in einem Gemisch aus Natriumacetat in Eisessig, also einem Medium mit Acetat als Nucleophil, aus. Intermediär entsteht ein Enolester, der bei der Aufarbeitung in wässrigem Medium zum8-Oxoderivat hydrolysiert wird.

Wird 8-Brom-guanosin-2'(3')-phosphat (2oc) als Ausgangsverbindung eingesetzt, so ergibt die papierchro-

matographische Analyse drei Hauptprodukte, die gleiches UV-Spektrum besitzen. Sie sind identisch mit dem von HOLMES und ROBINS [36] beschriebenem Spektrum für 8-Oxo-guanosin (23b).

Tabelle 1

Fliessmittel A	Rf : o.o7 + o.22 + o.45
Fliessmittel B	Rf : o.24 + o.3o + o.36 + o.51

Die zu Band Rf(A) o.o7 gehörende Substanz trennt sich in Fliessmittel B [39) 4o] in zwei Bänder mit Rf(B) o.36 + o.5o auf. Die zu Band Rf(A) o.22 gehörende Substanz wandert in Fliessmittel B mit einem Rf-Wert von o.24 und Band Rf(A) o.45 besitzt in Fliessmittel B einen Rf-Wert von o.3o. Die alkalische Hydrolyse des Reaktionsgemisches liefert in Fliessmittel A zwei Bänder mit Rf-Werten von o.o7 + o.o45 und in Fliessmittel B drei Bänder mit Rf-Werten von o.3o, o.36 und o.5o. Die zu Band Rf(A) o.22 gehörende Substanz ergab nach enzymatischer Hydrolyse in beiden Fliessmittelsystemen nur ein Band : Rf(A) : o.o7 und Rf(B) : o.36. Die Bänder mit Rf(A) o.o7 und o.22 ergaben eine positive Phosphatreaktion mit Ammoniummolybdat [41]. Der Nachweis der Diolstruktur bei Nucleosiden mit Bleitetraacetat in Eisessig misslingt, da die Base mit diesem Reagens selbst eine Reaktion eingeht.

Aus diesem Verhalten ergibt sich, dass sowohl 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat (Rf(A):o.o7, ca. 3o %, geschätzt aus der Intensität des Bandes) als auch 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (Rf(A):o.22, ca. 4o %) und 8-Oxo-Guanosin (Rf(A):o.45, ca. 1o %) entstanden ist.

Neben diesen drei Hauptprodukten konnten noch acetylierte Produkte in geringeren Mengen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde durch alkalische Hydrolyse der Estergruppen erbracht. Nach dieser Hydrolyse entstanden die bereits chromatographisch nachgewiesenen und identifizierten 8-Oxo-guanosin-derivate.

Eine Entsalzung über die Bleisalzfällung hätte den

Verlust des Cyclophosphates mit sich gebracht, das unter diesen Bedingungen nicnt als schwerlösliches Bleisalz ausfällt. Die Entstehung des Cyclophosphates,und die Acetylierung ist erklärbar, da unter den Reaktionsbedingungen - 13o bis 14o°C, frischgeschmolzenes, wasserfreies Natriumacetat in Eisessig - Acetanhydrid entsteht. D. M. BROWN et al.[42] haben eine Cyclisierung mit Trifluoracetanhydrid bei Raumtemperatur beschrieben. Da bei der Cyclisierung intermediär ein gemischtes Anhydrid entsteht, so ist auch die Dephosphorylierung verständlich.

Zunächst wurde eine Entsalzung über Sephadex G-lo versucht. Dabei wurde das Reaktionsgemisch in einem Minimum an Wasser gelöst und in einer schmalen Zone auf eine Sephadex G-lo Säule(3.8 man 83 cm für ca. 2g Reaktionsgemisch) geschichtet. Die Substanzen wurden mit Wasser eluiert und das Eluat fraktionierend gesammelt (5o ml/h, RadiRac-Fraktionskollektor LKB-Stockholm). Die Detektion der Nucleosid-derivate erfolgte mit einem Durchflussphotometer (Uvicord, LKB-Stockholm).

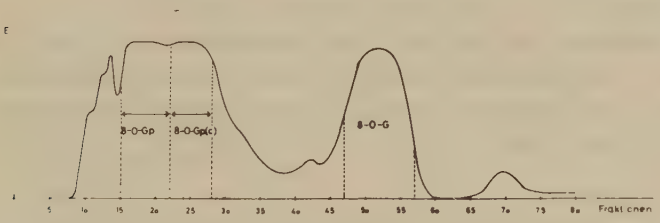


Abb. 1 . Trennung von 8-Oxo-guanosin-derivaten an Sephadex G-lo (3.8 mal 83 cm, eine Fraktion entspricht 25 ml Eluat = 1/2 h)

8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat (23c, Fraktion 15 - 22), 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (23a, Fraktion 23 - 28) und 8-Oxo-guanosin (23b, Fraktion 47 - 57) wurden gesammelt. Um Spuren von acetyliertem Produkt zu entfernen, wurde mit konzentriertem Ammoniak bei Raumtemperatur behandelt und anschliessend chromato-

graphisch gereinigt bzw. noch einmal über eine Sephadex G-lo Säule (1.8 mal 93 cm) getrennt gelfiltriert (12 ml/h). Durch geeignete Wahl der Säulenabmessungen und des Elutionsvolumens pro Zeiteinheit wird eine Auftrennung von Monoestergemisch und cyclischem Diester erreicht.

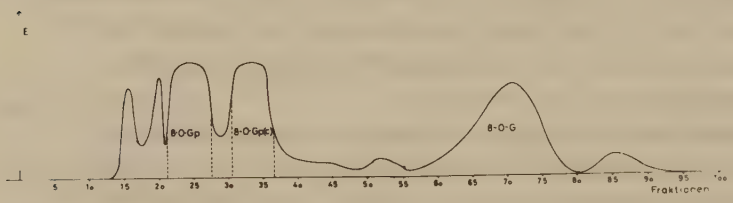
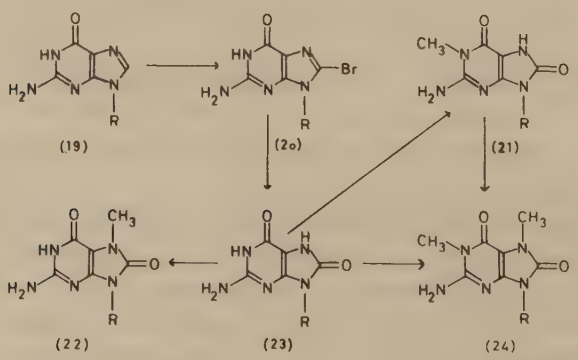


Abb. 2 . Trennung von 8-Oxo-guanosin-derivaten an Sephadex G-lo (1.8 x 93 cm, eine Fraktion entspricht 6 ml Eluat = 1/2 h)

Alkalische Hydrolyse und anschliessende Entsalzung über die Bleisalzfällung liefert 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat (23b). Das 8-Oxo-Guanosin wird mit dem Waschwasser bei der Zentrifugation entfernt.

Die erneute Cyclisierung des Monoesters wurde nach der Methode von M. SMITH et al.[43] mit Dicyclohexylcarbodiimid durchgeführt und das Produkt papierchromatographisch gereinigt.



R = a: ribofuranosyl-2'3'-cyclophosphat, b: ribofuranosyl, c: ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (23a) wird, wie von H.G. GASSEN et al.[3] schon festgestellt worden war, von RNase A bei Raumtemperatur in o.5 M Tris-puffer bei pH 7 vollständig zum 8-Oxo-guanosin-3'-phosphat hydrolysiert. M. IKEHARA et al.[38] fanden keine enzymatische Hydrolyse des Cyclophosphates in o.5 M Phosphatpuffer bei pH 7.4. Dabei wurde nicht berücksichtigt, dass Phosphationen Inhibitoren sind [44].

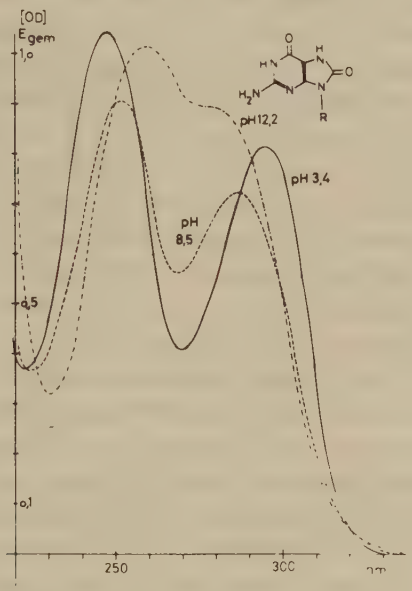


Abb. 3 . UV-Spektrum von 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat

2.) Methylierung von 8-Oxo-guanosin-derivaten.

Das Ziel war ein in 7-Stellung methyliertes 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (22a) aus 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat darzustellen.

2a.) Reaktion mit Dimethylsulfat.

Da das 8-Oxo-guanosin-2'3'-cyclophosphat (23a) zur Methylierung eingesetzt werden soll, ist es notwendig unter schonenden Reaktionsbedingungen zu arbeiten, d. h., der pH-Wert des Reaktionsgemisches darf nicht zu hoch sein, weil sonst eine alkalische Hydrolyse des cyclischen Diesters und anschliessend eine Veresterung der Phosphatgruppe eintreten kann. Es darf auch die Base nicht doppelt deprotoniert werden,da sonst eine Dimethylierung an N^1 und an N^7 stattfinden kann. Es war daher notwendig, die pK-Werte der Base des 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphates (23a) zu bestimmen. B. WEISSMANN et al. [45] bestimmten die pK-Werte des 8-Oxo-guanins (23 R = H) mit pK_a : o.o , 8.7 , 11.1 . Da für das entsprechende Nucleotid nicht unbedingt die gleichen pK-Werte gelten müssen, wurde zur Bestimmung eine etwas abgewandelte spektrophotometrische Methode nach D. SHUGAR und J. J. FOX [46] angewandt. Für die Base des Nucleotids wurden folgende pK-Werte gefunden : pK_a 8.6 und 11.6. Da die beiden pK-Werte sich nicht eindeutig zuordnen lassen, kann von vornherein nicht ohne weiteres entschieden werden, an welchem der beiden Ringstickstoffe N^1 oder N^7 die erste Deprotonierung stattfindet. Es ist auch noch nichts bekannt über die pK-Werte der beiden monomethylierten Produkte, die durchaus in der Nähe des pK-Wertes für die erste Deprotonierung der nichtmethylierten Verbindung liegen können.

Es wurde daher unter pH-stat-Bedingungen bei pH 8.6 gearbeitet und 6 - 1o Äquivalente Dimethylsulfat portionsweise bei Raumtemperatur unter Rühren zugegeben. Bei diesem pH-Wert ist eines der Stickstoffatome zu 5o % deprotoniert, so dass eine genügende Konzentration an Nucleophil von Anfang an vorhanden ist.

Das Reaktionsgemisch wurde nach der Entsalzung über Sephadex G-1o papierchromatographisch gereinigt. Zwei Bänder werden erhalten, die vom Ausgangsprodukt unterschiedliche Rf-Werte besitzen, von denen das weiter wandernde Produkt ein cyclischer Phosphorsäurediester ist (Rf(A) : o.5o). Das andere Band ist der entspre-

chende Phosphorsäuremonoester (Rf(A):o.2o), der durch Hydrolyse des Cyclophosphates entstanden ist. Das UV-Spektrum zeigt bei beiden Substanzen keine pH-Abhängigkeit und gleicht dem des 8-Oxo-guanosins in schwach saurem Medium.

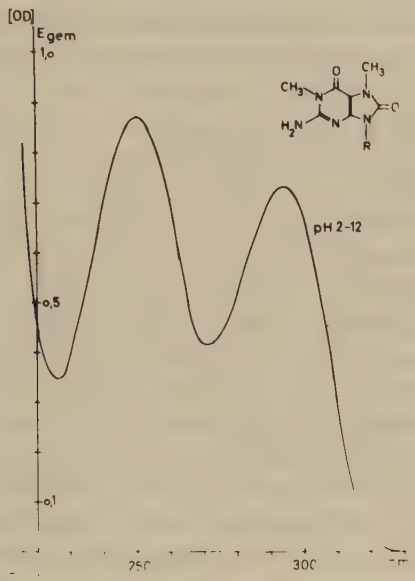


Abb. 4 . UV-Spektrum des N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-phosphats.

Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein N^1,N^7-dimethyliertes Produkt handeln muss (grosser Rf-Wert in Fliessmittel A, keine pH-abhängige spektrale Änderung). Diese Daten könnten auch dadurch interpretiert werden, dass durch eine Monomethylierung eine Verschiebung des pK-Wertes nach höheren pH-Werten stattgefunden hätte, obwohl eher anzunehmen ist, dass nach der ersten Methylierung der zweite pK-Wert niedriger liegen sollte. Das NMR-Spektrum liefert den Beweis, dass N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (24a) als einziges Methylierungsprodukt gebildet wird. Das Spektrum zeigt zwei Signale gleicher Inten-

sität bei 6.55 und 6.63 ppm(τ) (D_2O, TMS extern, pH 4).

Da unter diesen Bedingungen nur dimethyliertes Produkt entsteht, ist die Reaktion mit anderen Methylierungsagentien und bei anderen Reaktionsbedingungen untersucht worden. Um das schwerer zugängliche cyclische Phosphat für diese Versuche nicht aufzubrauchen, wurde die Methylierung am 8-Oxo-guanosin (23b) untersucht.

2b.) Reaktion mit Diazomethan.

J. A. HAINES et al.[47] erhielten bei der Reaktion von Tri-O-Acetyl-guanosin in methanolischer Lösung mit überschüssigem Diazomethan N^7-Methyl-guanosin, das mit dem von H. BREDERECK [48] ursprünglich als N^1-Methyl-guanosin angesehenen Produkt identisch war. Unter diesen Bedingungen entstand kein N^1-methyliertes Derivat. Das 8-Oxo-guanosin (23b), das zwar ein anderes aromatisches Ringsystem besitzt, wurde daher unter ähnlichen Bedingungen mit überschüssigem Diazomethan behandelt. In Methanol/Wasser wurde dabei nur ein Produkt mit einem Rf-Wert (A) von o.64 erhalten. Das UV-Spektrum ändert sich ebenfalls nicht über den gesamten messbaren pH-Bereich. Das NMR-Spektrum zeigt wieder zwei Signale : 6.67 und 6.74 ppm(τ) (DMSO-D_6, TMS extern), so dass auch hier wieder N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin (24b) entstanden war.

2c.) Reaktion mit N,N-Dimethyl-formamid-dimethyl-acetal.

J. ŽEMLIČKA [29] fand, dass bei der Umsetzung von Nucleosiden (z. B. Uridin, 6-Aza-uridin, Inosin) mit N,N-Dimethyl-formamid-dimethyl-acetal bei höheren Temperaturen (6o - 1oo°C) in N,N-Dimethyl-formamid die entsprechenden N^3-Pyrimidin- bzw. N^1-Purin-methylverbindungen entstanden. Aminogruppenhaltige Nucleoside reagieren schon bei Raumtemperatur zu den jeweiligen N,N-Dimethylaminomethylen-derivaten. So wird beim Guanosin wegen der Reaktion an der C-2-Aminogruppe keine Methylierung am N^1-Ringstickstoff beobachtet.

Das 8-Oxo-Guanosin (23b) reagiert mit N,N-Dimethyl-

formamid-dimethyl-acetal in N,N-dimethyl-formamid bei 110°C zu N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin (24b), das identisch ist mit dem Reaktionsprodukt der Diazomethanreaktion in bezug auf UV-Spektrum, Rf-Werte, Re-Werte und NMR-Spektrum. Die Reaktion der C-2-Aminogruppe schützt also in diesem Falle nicht die N^1-Stellung beim 8-oxo-guanosin. Bei Raumtemperatur bildet sich allerdings auch das N,N-Dimethyl-aminomethylen-derivat.

Zu N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin gelangt man ebenfalls, wenn man N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (24a), das mit Dimethylsulfat hergestellt worden war, mit 50 %iger Essigsäure zu dem 2',3'-Isomerengemisch des Monoesters hydrolysiert und anschliessend die Lösung bei pH 4.8 mit saurer Phosphatase inkubiert.

Ein endgültiger Beweis dafür, dass in allen Fällen ein dimethyliertes Produkt entstanden war, wurde dadurch erbracht, dass eindeutig synthetisiertes N^1-Methyl-8-oxo-guanosin (27b) (siehe unten) bei pH 9.4 mit Dimethylsulfat zu einem Produkt reagiert, das sich nicht von den oben beschriebenen unterscheiden lässt.

2d.) Darstellung von N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

Die Methylierungsagentien wurden bisher immer in grossem Überschuss angewandt. Lässt man jedoch 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat(23a) mit 1.5 Äquivalenten an Dimethylsulfat bei pH 8.6 unter pH-stat-Bedingungen reagieren, so entstehen bei chromatographischer Trennung in Fliessmittel A vier Bänder, von denen drei unterschiedliche Rf-Werte zum Ausgangsprodukt zeigen.

8-O-Gp(c)	Rf(A)	: 0.26
Reaktionsgemisch		: 0.26 + 0.29 + 0.39 + 0.50

Die UV-Spektren der zu Band Rf(A) 0.29 und Rf(A) 0.39 gehörenden Substanzen unterscheiden sich sowohl untereinander als auch von den beiden anderen Bändern. Band Rf(A) 0.26 bildete nahezu 50 % des Reaktionsgemisches und ist unverändertes Ausgangsprodukt, wie an Hand von Rf-Werten in Fliessmitel A und B, in der Papierelektro-

phorese und durch das UV-Spektrum nachgewiesen wurde. Die zu Band Rf(A) o.5o gehörende Substanz erwies sich nach den gleichen Identifizierungsmethoden als N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (24a), das zu ca. lo % entstanden war.

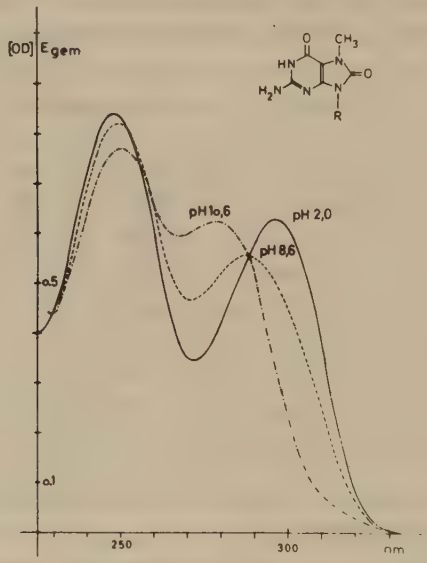


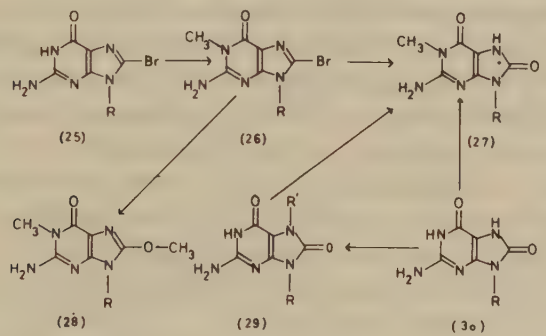
Abb. 5 . UV-Spektrum von N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

Die pK-Werte der zu Band Rf(A) o.29 und o.39 gehörenden Substanzen unterscheiden sich ebenfalls. Beide besitzen im Bereich von pH 1.5 bis pH 12.8 nur noch einen pK-Wert in bezug auf die Base und zwar die Substanz mit Rf(A) o.29 bei pH 8.7 und Substanz mit Rf(A) o.39 bei pH 9.9. Die unterschiedlichen Rf-Werte in Fliessmittel A sind somit auch sofort verständlich. Die NMR-Spektren der beiden Substanzen zeigen je ein Signal für eine Methylgruppe bei 6.58 und 6.67 ppm(τ) (D_2O, TMS extern). Die Signale liegen also im gleichen Bereich wie die der beiden Methylgruppen des

N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphates (24a). Mit den hier angegebenen Daten konnte noch immer nicht eine Zuordnung der beiden verschieden methylierten Substanzen erfolgen.

2e.) Darstellung von N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

Da sich also nicht entscheiden lässt, welche der beiden Substanzen das N^1- bzw. das N^7-methylierte Produkt ist, war es notwendig, eine der beiden Verbindungen auf völlig anderem Wege eindeutig zu synthetisieren. Die Darstellung von N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (21a) schien hier einfacher zu sein. Die Überlegung ging dahin, eine Methylgruppe in N^1-Position auf einer Zwischenstufe einzubauen, die noch keine 8-Oxo-funktion enthält.



a: R = ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat
b: R = ribofuranosyl
c: R = ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

8-Brom-guanosin (25b) wird nach einer Methode von A. D. BROOM et al.[50] für die Methylierung von Guanosin mit Methyljodid in Dimethylsulfoxid bei Anwesenheit von Kaliumcarbonat bei Raumtemperatur umgesetzt. Chromatographische Analyse in Fliessmittel **A**, B und **E** zeigt eine Verbindung, die sich von der Ausgangsverbindung auch im UV-Spektrum (keine pH-abhängige Ände-

rung) unterscheidet. Dieses N^1-Methyl-8-brom-guanosin (26b) ist anschliessend mit Natriumacetat in Eisessig in das 8-Oxo-derivat (27b) umgewandelt worden. Das UV-Spektrum der Verbindung zeigt die gleiche pH-Abhängigkeit wie dasjenige, der zu Band Rf(A) o.39 gehörende Substanz, die bei der Methylierung des 8-Oxo-guanosin-2':3'-phosphats mit Dimethylsulfat entstanden war.

Phosphorylierung des N^1-Methyl-8-oxo-guanosins (27b) mit Triäthylphosphit und Hexachloroaceton nach A. HOLÝ [51] ergibt eine Verbindung (27a), die in allen Daten identisch ist mit der von Band Rf(A) o.39 (21a).

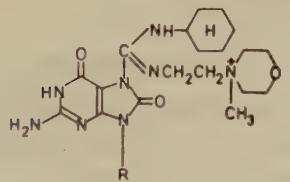
Somit kann also die zu Band Rf(A) o.29 gehörende Substanz als N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (22a) angesehen werden. Eine Mischung der beiden verschieden methylierten Cyclophosphate zeigt im NMR-Spektrum zwei Signale bei 6.58 und 6.67 ppm(τ) von denen das bei 6.67 ppm(τ) der N^1-Methylgruppe entspricht.

N^7-Methyl-8-oxo-guanin (22 R = H) wurde von B. WEISSMANN et al.[45) 52)] im menschlichen Harn nachgewiesen und von D. B. SPRINSON et al.[53)] synthetisiert. Da die UV-spektroskopischen Daten sich nur unwesentlich von nichtmethyliertem 8-Oxo-guanin (23 R = H) unterscheiden [54)], wurde auf eine Spaltung der Glycosidbindung des N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-phosphates (22a) zur weiteren Identifizierung der N^7-Methylverbindung über die Nucleotidbase verzichtet.

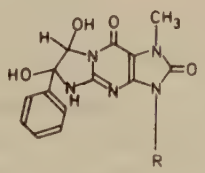
Da die Ausbeuten von N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (22a) und auch die absoluten Mengen bei der oben beschriebenen Synthese nur unbefriedigend sind, wurde versucht, das N^7-Methylderivat auf anderem Wege auch in etwas grösserem Massstab darzustellen.

N. W. Y. HO und P. T. GILHAM [30)] berichteten über die Umsetzung von 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (CMC) mit Nucleosiden und Ribonucleinsäuren. Guanosin und Guanosin-5'-phosphat werden dabei in N^1-Stellung substituiert. In Analogie zu dieser Reaktion wurde 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (30a) mit überschüssigem Carbodiimid (CMC) bei pH 8 bis 8.5 ca. fünf Stunden lang bei

Raumtemperatur reagieren lassen. Zur Reaktionslösung gab man anschliessend etwas Natriumacetat, um genügend Gegenionen zu Tosylat und Cyclohexyl-morpholinoäthyl-methyl-harnstoff in der Lösung zu haben, entsalzte über Sephadex-G-lo und reinigte anschliessend papierchromatographisch. Das Reaktionsprodukt (29a) unterscheidet sich sowohl in dem Rf-Wert (A : o.39) als auch im UV-Spektrum noch von dem Ausgangsprodukt, d. h., die Schutzgruppe ist demnach noch nicht abgespalten worden. Unter pH-stat-Bedingungen wurde anschliessend bei pH 8.5 mit überschüssigem Dimethylsulfat methyliert. Das Reaktionsprodukt unterscheidet sich sowohl im UV-Spektrum als auch in den Rf-Werten von dem Ausgangsprodukt und enthält noch die Schutzgruppe. Durch milde alkalische Hydrolyse mit Ammoniak erhielt man nach Reinigung über Dowex 5o Kationenaustauscher (Ammonium-form) zur Adsorption des substituierten Harnstoff-Kations und anschliessender papierchromatographischer Trennung N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (27a) als einziges Reaktionsprodukt in relativ guten Ausbeuten.



(31)



(32)

Im Gegensatz zur Reaktion mit Guanosin reagiert CMC mit 8-Oxo-guanosin-derivaten nicht mit dem N^1-Ringstickstoff, sondern mit dem N^7-Ringstickstoff. Ein Beweis hierfür wird weiter unten auch noch bei der Reaktion von 8-Oxo-guanosin-derivaten mit Phenylglyoxal erbracht.

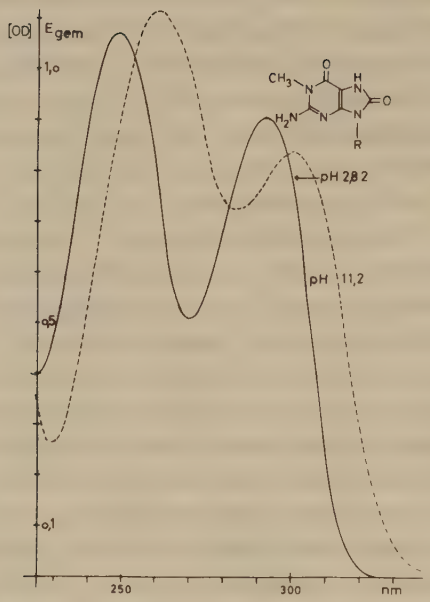


Abb. 6 . UV-Spektrum von N^1-Metnyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat .

2f.) Darstellung von N^1-Methyl-8-methoxy-guanosin.

Um noch chemische Beweise für die Identität der beiden verschieden metnylierten Verbindungen zu erbringen, waren noch zwei weitere Wege beschritten worden.

Bei den metnylierten Verbindungen wäre eine O-Methylierung theoretisch möglich gewesen. Um solche Verbindungen, vor allem das 8-Methoxy-derivat, sicher von den erhaltenen Substanzen unterscheiden zu können, ist N^1-Metnyl-8-methoxy-guanosin (28b) dargestellt worden.

R. E. HOLMES und R. K. ROBINS [36] synthetisierten das 8-Methoxy-adenosin, indem sie 8-Brom-adenosin in methanolischer Metnylatlösung 17 Stunden lang unter Rückfluss kochten. Da beim 8-Brom-guanosin (2ob) in stark alkalischem Medium durch Deprotonierung am

N^1-Ringstickstoff die Elektrophilie des C-8-Kohlenstoffatoms für einen nucleophilen Angriff des Methylates nicht gross genug ist, wurde das N^1-Metnyl-8-brom-guanosin (26b) verwendet. Kocnen unter Rückfluss mit überschüssigem Methylat liefert das 1-Methyl-8-methoxy-guanosin (28b) das sich sowohl im UV-Spektrum als auch im NMR-Spektrum (zwei Signale für zwei Methylgruppen bei 382 cps für N^1-Me und 457 cps für Me-O, gegen TMS extern, D_2O pH 4, Varian HA loo (!)) charakteristisch von den anderen methylierten Produkten unterscheidet.

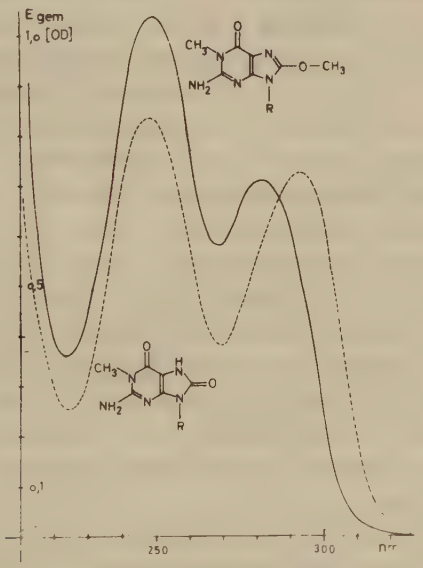


Abb. 7 . UV-Spektrum von N^1-Methyl-8-methoxy-guanosin und N^1-Methyl-8-oxo-guanosin bei pH 4.

Beim Versucn die Verbindung zu phosphorylieren, trat stets eine Ätherspaltung auf und man erhielt N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phospnat (27c) neben anderen Reaktionsprodukten.

2g.) Reaktion mit Phenylglyoxal

Ein weiterer chemischer Nachweis für die richtige Struktur der beiden N^1- und N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-derivate kann durch die Umsetzung mit Phenylglyoxal erbracht werden. Es ist schon verschiedentlich über die Reaktion von 1,2-Dicarbonylverbindungen mit Nucleosiden und Nucleinsäuren berichtet worden [55-59]. K. TAKAHASHI [60] berichtete kürzlich über die Umsetzung von Arginin mit Phenylglyoxal, das bei pH 8 - 8.2 bei Raumtemperatur wesentlich schneller als Glyoxal oder Methoxal reagiert.

Guanosin-derivate besitzen an ihrem C-2-Atom ebenfalls eine Guanidinstruktur. Wenn also die C-2-Aminogruppe und der N^1-Ringstickstoff unsubstituiert sind, sollte sich ein ähnliches Produkt mit Phenylglyoxal bilden, wie bei den bereits beschriebenen Derivaten [55-59].

Guanosin-2'(3')-phosphat und 8-Oxo-guanosin-derivate wurden in o.o5 M Phosphatpuffer von pH 8.2 gelöst und mit einer 3%igen Phenylglyoxallösung versetzt und drei Stunden lang bei Raumtemperatur stehen lassen. Nach Chromatographie in Fliessmittel F zeigte es sich, dass nur die am N^1-Ringstickstoff nicht substituierten Derivate eine Reaktion mit Phenylglyoxal eingegangen sind.

Die Struktur solcher Verbindungen ist von R. SHAPIRO et al. [59] aufgeklärt worden. Die 8-Oxo-guanosin-derivate besitzen danach eine Struktur wie sie in (32) abgebildet ist.

Mit Hilfe dieser Reaktion konnte auch die Substitutionsstelle des Carbamidino-derivates (31) festgestellt werden. Nach der Reaktion mit Phenylglyoxal entstand aus (31) eine neue Verbindung, die in Fliessmittel F etwas weiter als die Ausgangsverbindung wanderte. Dieses beweist, dass der N^1-Ringstickstoff neben der C-2-Aminogruppe vorher unsubstituiert gewesen sein muss.

Tabelle 2

Rf-Werte der Phenylglyoxal-Reaktionsprodukte in Fliessmittel F

N^1-Me-8-O-Gp(c) (27a)	Rf : o.43	
Umsetzung	: o.43	
N^7-Me-8-O-Gp(c) (22a)	: o.5o	
Umsetzung (32)	:	o.85
8-O-Gp(c) (23a)	: o.51	
Umsetzung	:	o.8o
CMC-8-O-Gp(c) (31)	: o.84	
Umsetzung	:	o.9o
Gp (19c)	: o.16	
Umsetzung	: o.16	o.4o
N^1,N^7-Di-Me-8-O-Gp(c) (24a)	: o.7o	
Umsetzung	: o.7o	

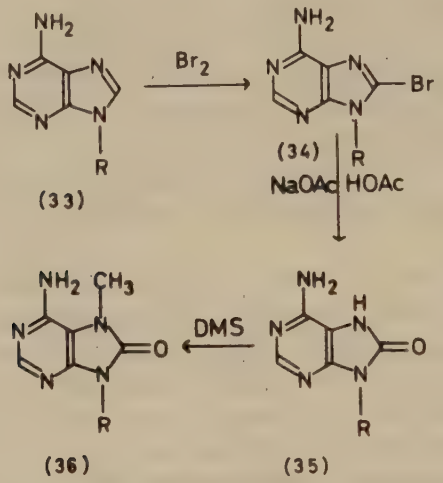
3.) Methylierung von 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat.

Gibt es bei der Methylierung von 8-Oxo-guanosin-derivaten noch zwei Möglichkeiten einer Substitution, so sollte beim 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat (35a) nur noch der N^7-Stickstoff für eine Methylierung unter den oben beim 8-Oxo-guanosin beschriebenen Bedingungen zugänglich sein.

P. BROOKS und P. D. LAWLEY [61] erhielten aus Adenosin und Dimethylsulfat in N,N-Dimethylformamid bei 15o° C sowohl ein N^3- als auch ein N^1-Methyl-derivat. Daneben entstand ein dimethyliertes Produkt, das vermutlich infolge einer Dimroth-Umlagerung [62] in ein N^3-Methyl-6-Methylamino-derivat umgewandelt worden ist. Als quartäre Salze sollten solche Verbindungen cnromatographisch aber gut von den anderen ringsubstituierten Verbindungen unterscheidbar sein.

Als Zwischenprodukt dient auch hier wieder die 8-Bromverbindung.(34c). Analog M. IKEHARA et al.[63) 64)] wird Adenosin-2'(3')-phosphat (33c) in der äquimolaren Menge an o.1 N NaOH gelöst und mit der äquivalenten Menge an Bromwasser bei Raumtemperatur bromiert. Nach

der Reinigung über die Bleisalzfällung wird mit Natriumacetat in Eisessig [63] das 8-Oxo-adenosin-2'(3')-phosphat (35c) dargestellt.



a : R = ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat
b : R = ribofuranosyl
c : R = ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat (35a) ist wie das analoge 8-Oxo-guanosin-derivat ein Substrat für RNase A.

Im Gegensatz zu Adenosin sollte die Methylierung des 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphates unter wesentlich milderen Bedingungen durchführbar sein und ausschliesslich in N^7- Stellung erfolgen.

Unter pH-stat-Bedingungen ergab die Methylierung des cyclischen Diesters eine Substanz (36a), die im NMR-Spektrum ein zusätzliches Signal für drei Protonen bei 6.41 ppm(τ) (D_2O, TMS extern, pH 4) enthält und deren UV-Spektrum nur noch einen pK-Wert bei 2.7 erkennen lässt, während die nicntmethylierte Verbindung (35a) zwei pK-Werte bei pH 2.9 und pH 8.6 besitzt.

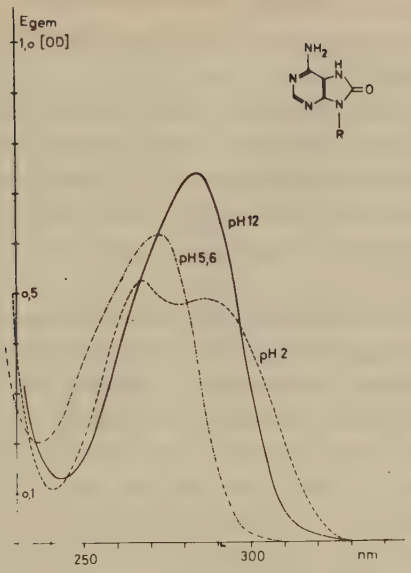


Abb. 8 . UV-Spektrum von 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat.

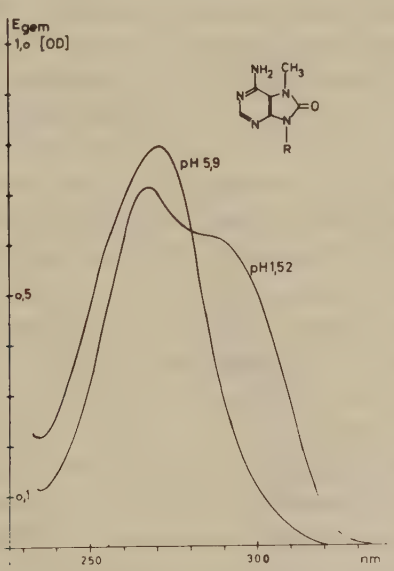


Abb. 9 . UV-Spektrum von N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat.

II.) Alkylierung und Methylierung von Uridin- und N^3-Harnsäure-ribosid-derivaten.

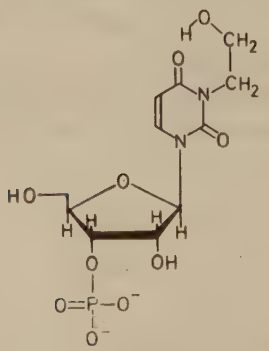
1.) Darstellung von N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-cyclophosphat.

Um zu überprüfen, ob nur die Substitution am N^3-Stickstoff des Uridins durch einen hydrophoben Substituenten wie z. B. die Methylgruppe, die Fixierung der Base durch das Enzym verhindert, ist N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-cyclophosphat (37 aber cycl. Diester) synthetisiert worden.

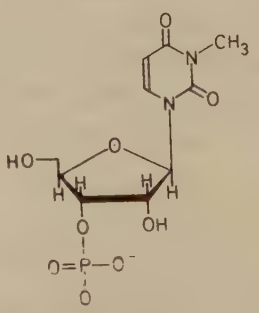
Die Hydroxyäthylgruppe sollte weniger hydrophob sein als eine Methylgruppe. Ein geeigneterer Substituent wäre zweifellos eine Hydroxymethylgruppe gewesen, doch ergibt die Reaktion mit Formaldehyd zwar ein N^1-substituiertes Produkt, das aber nicht in Substanz isoliert werden kann[65]. Während man in neutralem bis schwach alkalischem, gepuffertem Medium bei Raumtemperatur nur ein Umsetzungsprodukt mit Nucleosiden erhält, die primäre Aminogruppen enthalten und zu Schiffschen Basen oder Aminomethylolverbindungen [66] [67] führen, ergibt die alkalisch oder sauer katalysierte Reaktion mit Pyrimidinnucleosiden nur 5-Hydroxymethyl-derivate [68].

Zur Einführung der Hydroxyäthylgruppe wurde N,N-Dimethyl-formamid-äthylen-acetal verwandt, das mit Uridin in N,N-Dimethylformamid bei 110°C N^3-Hydroxyäthyl-uridin- analog der Umsetzung mit N,N-Dimethyl-formamid-dimethylacetal ergibt.

Nach der Phosphorylierung erhält man das entsprechende Cyclophosphat, das durch RNase A nicht zum 3'-Monoester hydrolysiert wird.



(37)

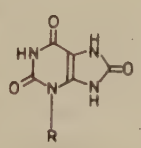


(38)

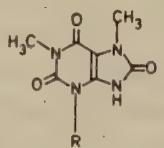
2.) Darstellung von N^1,N^7-Dimetnyl-N^3-Harnsäure-ribosid-2':3'-cyclophosphat .

N^3-Harnsäureribosid (39b) besitzt die gleiche glycosidische Verknüpfung am Pyrimidinring wie das Uridin. Eine Metnylierung sollte sich hier in erster Linie in der N^1-Stellung (des Purinringes) auswirken, d. h., ein in N^1-Stellung methylsubstituiertes N^3-Harnsäureribosid sollte als cyclischer Phosphorsäurediester wie das N^3-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat (38 aber Cyclophosphat) kein Substrat für RNase A sein.

Metnylierung von N^3-Harnsäureribosid (39b) mit N,N-Dimetnyl-formamid-dimetnylacetal bei 110°C in N,N-Dimethylformamid liefert ein Produkt, das in seinem UV-Spektrum im pH-Bereich zwischen pH 1 und pH 12 keine Änderung zeigt.



(39)



(40)

a : R = ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat
b : R = ribofuranosyl
c : R = ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

Das NMR-Spektrum zeigt zwei Signale bei 6.02 und 6.22 ppm (τ) (D_2O , TMS extern), die zwei mal drei Protonen zugeordnet werden können. Das Maximum des UV-Spektrums liegt bei 291 nm. Für die N^1,N^3,N^7-Tri-methyl-harnsäure geben F. BERGMANN et al.[69] ein Maximum bei 289 nm an, während die N^3,N^7,N^9-Tri-methyl-harnsäure das UV-Maximum bei 294 nm besitzt [69]. Der Schluss liegt nahe, dass es sich bei diesem Reaktionsprodukt um das N^1,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäureribosid (40b) handelt. Phosphorylierung nach A. HOLÝ [51] ergab das entsprechende Cyclophosphat (40a), das kein Substrat mehr für RNase A ist.

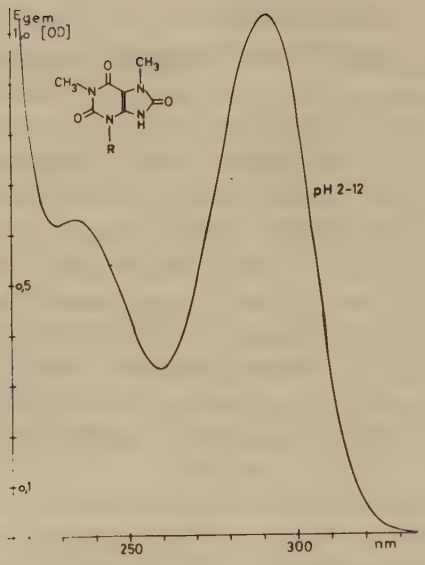


Abb. 1o . UV-Spektrum von N^1,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat.

d.) Schlussfolgerungen.

Alle hier untersuchten methylierten und alkylierten N^3-Methyl-pyrimidin- bzw. N^7-Methyl-purin- und N^1,N^7-Dimethyl-purin-derivate sind im Gegensatz zu den nicht-methylierten Verbindungen keine Substrate für die RNase A. Dieser Befund schliesst aus, dass die Methylprotonen durch einen direkten Feldeffekt die Basenkatalyse der C-2-Carbonylgruppe beeinträchtigt. Es gewinnt dadurch die Alternative an Bedeutung, dass die Methylgruppe die Wechselwirkung zwischen Nucleotidbase und Phe 12o des Enzyms stört und dass diese Wechselwirkung als Fixierung der katalysierenden Nucleotidbase für die enzymatische Reaktion unbedingt notwendig ist.

C.) Untersuchungen über die Natur der Wechselwirkung der Nucleotidbase mit dem Enzym.

Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen galt es nun eine experimentelle Methode zu finden, die es erlaubt, eine Wechselwirkung oder Fixierung, d. h., eine unspezifische Bindung zwischen Enzym und Nucleotidbase zu erkennen.

Aus den Rötgenstrukturuntersuchungen von H. W. WYCKOFF et al.[20] und G. Kartha et al.[22] geht hervor, dass bei dem Komplex aus Enzym und Pyrimidin-mononucleotid die Base in der Nähe von Phe 120 liegt, eventuell sogar direkt aufliegt. Folgende Befunde sprechen weiterhin für diese Annahme : 1. Phenylalanin 120 folgt auf Histidin 119, das mit Sicherheit an der Bindung der Phosphatgruppe beteiligt ist. 2. Keine andere aromatische Aminosäure befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums. 3. Eine Nitrierung der Tyrosine mit Tetranitromethan[16] beeinflusst nicht die Bindung von Substrat oder Inhibitor. 4. Die Annahme einer Beteiligung eines Phenylalanins wird durch NMR-Untersuchungen an Enzym-Inhibitor-Komplexen gestützt [17] [18]. Hier zeigt das Dublett des C-6-Protons der Pyrimidinbase eine Verschiebung nach niedrigerem Feld, während gleichzeitig die aromatischen Protonen der Aminosäure nach höherem Feld verschoben werden. Diese Verschiebungen sind durch Ringstromeffekte an beiden Aromaten erklärt worden.

Wenn eine solche Wechselwirkung zwischen den Aromaten des Enzyms und der Nucleotidbase besteht, so sollte diese über die pi-Elektronensysteme gehen und im Spektrum erkennbar sein.

Als aromatische Verbindungen zeigen sowohl Phenylalanin als auch die Nucleotidbasen mehr oder weniger starke Absorptionsbanden im UV-Bereich von 200 bis 350 nm. Registriert man die UV-Absorption über diesen Wellenbereich von Inhibitor- und RNase-Lösung, die sich im Referenz- und Probenkanal in getrennten Kammern in einer Tandemküvette im Spektrometer befinden, so zeigt sich nach der Durchmischung der beiden Lösungen im Probenkanal ein charakteristischer Unterschied in der UV-Absorption.

Tritt keine Bindung auf, fehlt dieser Effekt.

I.) Faktoren, die diese Wechselwirkung beeinflussen können.

Wie in vorhergehenden Arbeiten gezeigt worden ist, sind die dianionischen Mononucleotide starke Inhibitoren, die primär an der Phosphatgruppe gebunden werden. Diester, auch substratanaloge Diester, werden nicht gebunden und hemmen nicht die Reaktion. Das gleiche gilt für Nucleinsäure-derivate, die keine Phosphatgruppe besitzen, wie z. B. die Basen allein, Nucleoside oder Nucleosid-2'(3')-phosphitester. Von diesen Verbindungen sind auch keine Differenzspektren bekannt. Ein in der Literatur angegebenes Differenzspektrum von Thymidin-3'-phosphorsäurebenzylester [23] konnte nicht bestätigt werden, während der Monoester, wie erwartet ein solches liefert.

Unter den Mononucleotiden werden nur die 2'- und 3'-Phosphate analog den Substraten gebunden. Dadurch ergeben sich für die 5'-Nucleosid-phosphate nur sehr kleine Effekte [12) 23)], die aber bei den 5'-Diphosphaten und 5'-Triphosphaten verstärkt herauskommen. Diese Spektren weichen aber von denen der 2'- und 3'-Nucleosid-phosphate ab und zeigen dadurch an, dass sie für das Studium der Wechselwirkung zwischen Substratbase und Enzym nicht geeignet sind.

Es zeigt weiterhin, dass der Abstand zwischen der bindenden Phosphatgruppe und der Base kritisch ist, so dass auch bei den Nucleosid-2'(3')-phosphaten andere Effekte zu erwarten sind, wenn die Base eine andere Stellung zum Zuckerring einnimmt.

Nimmt man weiterhin an, dass die Wechselwirkung nur zwischen den pi-Elektronensystemen existiert, so muss man fordern, dass sich beide Aromatenringe parallel aufeinanderlegen. Substituenten, die die Ausdehnung des pi-Elektronensystems überragen, sollten dann die Wechselwirkung stören, es sei denn, die Base wird in eine andere Stellung verschoben, in der der Substituent den Aromatenkern nicht mehr überlappt.

Zur Klärung können Nucleosid-phosphate beitragen, die sowohl im Basenteil, als auch in ihrer Konformation modifiziert sind. Bei der Synthese dieser Verbindungen sollte noch ein weiterer Aspekt berücksichtigt werden. A. DEAVIN et al.[23] hatten das Auftreten der Differenzspektren damit erklären wollen, dass basische oder protonierende Gruppen am Enzym in Form von Wasserstoffbrücken mit der Nucleotidbase reagieren und dadurch eine Fixierung der Base auf dem Phenylalaninring bewirken [7o]. Bei einer solchen Annahme sollten in den Differenzspektren besonders die n - pi^* - Übergänge betroffen sein. Es galt deshalb auch solche Nucleosid-phosphate zu synthetisieren, die die nach A. DEAVIN et al.[23] geforderten Donor- und Acceptor-Gruppen nicht besitzen und auch solche, die im Basenteil eine deprotonierbare Gruppe im pH-Bereich der Bindung an das Enzym haben und sowohl in der Neutralform als auch als Anion in bezug auf die Base untersucht werden können.

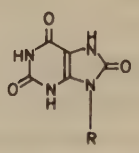
Hierzu waren geeignet : 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert von 6.45, N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert von 6.o, N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert von 4.7 und 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-2'(3') -phosphat.

II.) Darstellung von Nucleosid-phosphaten, die im Basenteil modifiziert sind.

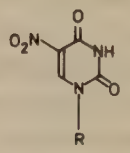
1.) Darstellung von 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat (42c) bzw. 5-Nitro-uridin-2':3'-cyclophosphat.

5-Nitro-uridin (42b) wurde nach einer Vorschrift von I. WEMPEN et al.[71] durch Nitrierung von 2',3',5'-Tri-O-dinitrobenzoyl-uridin mit Salpetersäure und anschliessender alkalischer Abspaltung der Schutzgruppen mit Natriumäthylat dargestellt. Das bisher noch unbekannte Nucleosid-phosphat wurde durch Umsetzung des 5'-tritylgeschützten Derivates mit beta-Cyanoäthylphosphat nach G. M. TENER [72] und anschliessender Ätherspaltung mit Essigsäure bei Raumtemperatur erhalten. Die Cyclisierung wurde nach A. M. MICHELSON [73] mit Chlorameisensäureäthylester und Tri-n-butylamin ausgeführt. Der 2':3'-cycli-

sche Diester (42a) ist ein Substrat für RNase A.



(41)



(42)

a: R = ribofuranosyl-2':3'-cyclophosphat
b: R = ribofuranosyl
c: R = ribofuranosyl-2'(3')-phosphat

2.) Darstellung von N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat (39a) und N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat (39c).

N^3-Harnsäureribosid (39b) wurde in Anlehnung an die Methode von H. S. FORREST et al.[74] nach einem modifizierten Verfahren aus Rinderblut isoliert, das Nucleosid anschliessend nach A. HOLÝ [51] mit Triäthylphosphit und Hexachloroaceton zum cyclischen Diester (39a) phosphoryliert, der, wie H. G. GASSEN et al.[3] nachgewiesen hat, ein Substrat für RNase A ist. Das 2'(3')-Monoestergemisch wurde durch Hydrolyse in 5o %iger Essigsäure bei 5o°C erhalten.

3.) Darstellung von N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat (41c).

Durch Deaminierung von 8-Oxo-Guanosin-2'(3')-phosphat (23c) mit der äquivalenten Menge an Natriumnitrit in 1-N-Schwefelsäure [38] konnte unmittelbar das 2'(3')-Phosphat des N^9-Harnsäureribosids (41c) gewonnen werden.

4.) Darstellung von 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-2':3'-cyclophosphat (48) bzw. -2'(3')-phosphat (47).

Die Synthese dieser Verbindung war bisher noch nicht beschrieben worden. (Während der Fertigstellung dieser Arbeit erschien in den Chemical Abstracts eine Notiz, dass

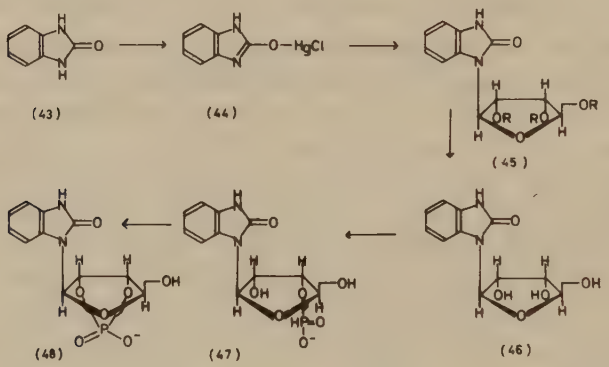
das Nucleosid von L. B. TOWNSEND et al.[75] auf dem Wege über das Bis-trimethylsilyl-derivat des Benzimidazolthions hergestellt worden ist. die von den Autoren gegebenen Daten der Verbindung stimmen mit dem hier auf andere Weise dargestellten Produkt überein.)

Nach J. DAVOLL und B. A. LOWY [76] ergeben die Quecksilbersalze von Purinen mit Acylhalogenzucker-derivaten Purinnucleoside. Diese Methode, die auch auf Pyrimidin-[77] und Pyridin-derivate [78] angewendet werden kann, liefert häufig primär die O-Glycoside, die mit Quecksilber-(II)-bromid in siedendem Xylol [79] zu den N-Glycosiden umgelagert werden. Dabei entstehen unter Beteiligung der C-2'-Estergruppe des Acylzucker-derivates ausschliesslich N-beta-D-Ribofuranoside [8o]. J. A. MONTGOMERY et al.[81] fanden bei Schmelzreaktionen von heteroaromatischen Quecksilbersalzen mit Acylhalogenzucker-derivaten z. T. einen beträchtlichen Anteil an alpha-Anomeren. E. WALTON et al.[82] M. PRYSTAŠ et al.[83] finden bei der Hilbert-Johnson-Reaktion [84] unter bestimmten Bedingungen ebenfalls alpha-Anomere. Unter den hier angegebenen Reaktionsbedingungen sind für die Quecksilbersalzreaktion bisher noch keine N-alpha-D-Anomere beschrieben worden [68]. Die in der Nucleosidsynthese ebenfalls häufig angewandt Trimethylsilyl-Methode [85] [86] führt bei Benzimidazolon-(2) als Ausgangsverbindung zu keinem Nucleosid, da das N^1,N^3-Bis-trimethylsilyl-benzimidazolon-(2), das bei der Umsetzung des Benzimidazolon-(2) mit Trimethylsilylchlorid entsteht, nicht mit der Acylhalogenribose unter den von L. BIRKOFER et al.[85] angegebenen Bedingungen reagiert.

Nach diesen Überlegungen wurde hier die Quecksilbersalzmethode angewandt.

Benzimidazolon-(2) (43) wurde in Analogie zu dem von T. UKITA et al.[87] beschriebenen Verfahren zur Synthese von Pyridon-quecksilber-monochlorid mit Quecksilber-(II)-chlorid umgesetzt. Das entstandene Organo-quecksilberchlorid (44) wurde nach G. WAGNER [78] in siedendem Xylol mit 1-Chloro-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranose [88] und Quecksilber-(II)-bromid kondensiert. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit ammoniakalischem Methanol bei Raum-

temperatur erhält man in 16 %iger Ausbeute das entsprechende N^1-beta-D-ribofuranosyl-Benzimidazolon-(2) (46). Das IR-Spektrum zeigt eine starke Carbonylbande bei 1710 cm^{-1}. Das Benzimidazolon-(2) zeigt bei 1720 cm^{-1} eine starke Carbonylbande, während das Quecksilbersalz (44) eine starke Bande bei 1600 cm^{-1} zeigt, die einer C=N Schwingung zugeordnet werden kann. Durch Vergleich der UV-Spektren mit 2-Äthoxy-benzimidazol und 1,3-Dimethyl-benzimidazolon-(2) [89] konnte eine O-Glycosidierung ausgeschlossen werden.



Die Tatsache, dass eine O-N-Umglycosidierung stattgefunden hat, ist insofern bemerkenswert, da in der Pyrimidin- und Pyridin-reihe bei Substanzen mit Substituenten in 6-Stellung, d. h., in Nachbarstellung zur neu zu bildenden N-glycosidischen Bindung bisher noch keine Umglycosidierung beobachtet worden ist [78]. PFLEIDERER et al.[90] konnten nach dieser Darstellungsmethode in der Chinoxalin-reihe nur die O-Glycoside erhalten. Schwefelhaltige Fünfring-heteroaromaten mit ankondensiertem Benzolring wie z. B. Benzoxazolthion-(2) und Benzthiazolthion-(2) ergeben nach H. ZINNER und K. PESEKE [91] dagegen eine S-N-Umglycosidierung. Dieses wäre immer noch mit der Annahmne von G. WAGNER [78] verträglich, dass in Sechsring-heteroaromaten nach Substitution in alpha-Stellung die O-N-Umglycosidierung sterisch behindert ist,

Dagegen scheinen bei Fünfringen die Substituenten etwas weiter voneinander entfernt zu sein und deshalb die Umglycosidierung zu erlauben.

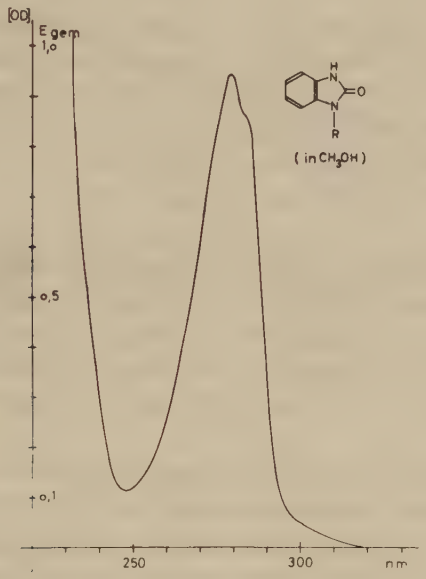


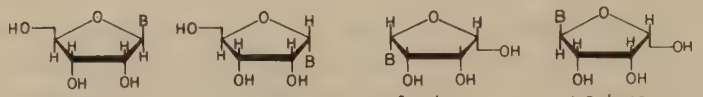
Abb. 11 . UV-Spektrum von N^1-(beta-D-ribofuranosyl)-benzimidazolon-(2) .

Die Phosphorylierung des Nucleosids erfolgte nach A. HOLY [51] . Der 2':3'-cyclische Diester (48) ist kein Substrat mehr für RNase A.

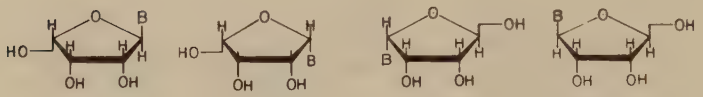
III.) Nucleosid-phosphate, die im Zuckerteil modifiziert sind.

Um die Auswirkung bei verschieden räumlicher Anordnung von Phosphatgruppe und Nucleotidbase auf die Fixierung der Base an das Enzym zu untersuchen, sind zunächst Nucleosid-phosphate mit verschiedenen anomeren und epimeren Pentofuranosen und -pyranosen ausgewählt worden. Bei den beta-D-Ribofuranosyl-nucleosiden steht die Base trans zur C_2'- und C_3'-OH-Gruppe des Zuckers und auf der

gleichen Ringseite wie die 5'-Hydroxymethylgruppe. Bei den anomeren alpha-D-Ribofuranosiden stehen C_2'-, C_3'-OH-Gruppe und die Base cis-ständig und auf der entgegenge-



(49) (50) (51) (52)



(53) (54) (55) (56)

setzten Ringseite wie die Hydroxymethylgruppe. Bei den epimeren D-Lyxofuranosiden stehen bei dem beta-D-Anomeren die Base, C_2'-, C_3'-OH-Gruppe und die C_4'-Hydroxymethylgruppe auf der gleichen Ringseite. Bei den alpha-D-Anomeren ist nur die Stellung der Base am C_1'-Atom trans-ständig zu den übrigen funktionellen Gruppen. Die Nucleoside der L-Reihe sind die chiralen Enantiomeren. Aus dem Schema erkennt man, dass unter den acht verschiedenen Derivaten je zwei sich bis auf die Stellung der C_4'-Hydroxymethylgruppe gleichen, und zwar :

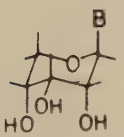
beta-D-ribo-(49) und alpha-L-lyxo-Derivat (53),
alpha-D-ribo-(5o) und beta-L-lyxo-Derivat (54),
beta-L-ribo-(56) und alpha-D-lyxo-Derivat (52),
alpha-L-ribo-(55) und beta-D-lyxo-Derivat (51).

Bei den entsprechenden Nucleosid-phosphaten ist die Stellung von Phosphatgruppe und Base für je zwei der oben aufgeführten Nucleoside gleich. Einziges Unterscheidungsmerkmal ist die Stellung der C_4'-Hydroxymethylgruppe. Substituenten in 5'-Stellung beeinträchtigen die enzymatische Reaktion nur unwesentlich, wie am Beispiel des 5'-Deoxy-uridin-2':3'-cyclophosphates [92], 5'-O-Methansulfonyl-uridin-2':3'-cyclophosphates [93], 5'-Brom-5'-deoxy-

uridin-2':3'-cyclophosphates [93] und am ApCp(c) [94] gezeigt worden ist. Auch die unterschiedliche Stellung der Hydroxymethylgruppe am C_4'-Atom bei den Lyxo-derivaten sollte die Bindung an das Enzym gegenüber den Ribo-derivaten nicht beeinflussen, wie A. HOLÝ und F. ŠORM [19] am alpha-L-Lyxofuranosyl-thymin-2':3'-cyclophosphat gezeigt haben.

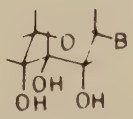
Für die Untersuchungen der Enantiomeren und Anomeren Verbindungen wurden die gleichen Basen verwendet, die in der beta-D-Ribofuranosyl-reihe schon eine Wecnselwirkung mit dem Enzym zu erkennen gaben, hauptsächlich Cytosin, Thymin, Adenin und Uracil.

Neben den Ribofuranosyl-nucleosid-phosphaten wurden auch noch die vier enantiomeren und anomeren Ribopyranosyl-thymin-2'(4')-phosphate untersucht. Auch hier sollte sich die unterschiedliche räumliche Lage von Base und Phosphatgruppe auf das Differenzspektrum auswirken.



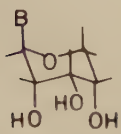
β-D-ribopyranosyl-

(57)



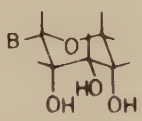
α-D-ribopyranosyl-

(58)



β-L-ribopyranosyl-

(59)



α-L-ribopyranosyl

(60)

Tabelle 3

Differenzspektroskopische Daten

Tabelle 3

Differenzspektroskopische Daten

Verbindung(+)	λ_{max} (nm)	ϵ	Konzentr. (Nucleotid) (10^{-5} mol/l)
1.) Uridin-	262	10.000 [98]	3.4 6.8 (Abb.13D) 13.7
2.) 5-Methyl-uridin-	267	9.800 [99]	3.8 7.6 (Abb.13 C) 15.0
3.) 5-Fluor-uridin-	269	9.000 [100]	9.3 (Abb. 13 E)
4.) 5-Brom-uridin-	270	9.600 [101]	10.2 (Abb.13 B) 20.3
5.) 5-Jod-uridin-	274	6.260 [102]	8.1 (Abb. 13 F)
6.) 5-Hydroxy-uridin-	280	8.200 [101]	4.9 9.6 (Abb.13 A) 19.4
7.) 5-Dimethyl-amino-uridin-	292	9.500	8.0 16.1 (Abb. 14 C)
8.) Pseudo-uridin-	262	7.900 [103]	9.2 (Abb.14 B) 18.3
9.) 5-Nitro-uridin- (pH5.6)	305	10.100 [71]	2.0 (Abb.17 A)
5-Nitro-uridin-(pH 6.0)	311	10.300	2.0
5-Nitro-uridin-(pH 7.0)	322	14.000	2.5 (Abb.17 B)
10.) 4-Thio-uridin-	330	21.000 [104]	3.7 (Abb.14 A)
11.) 4-Thiomethyl-uridin-	296	9.100 [105]	12.6 (Abb.14 E) 6.3 21.1
12.) 6-Methyl-uridin-	261	11.200 [106]	16.5 (Abb.26 C)
13.) 5.6-Dimethyl-uridin-	268	10.400 [106]	7.7
14.) Orotidin-	267	9.570 [107]	7.4 (Abb.26 A) 14.7
15.) 3-Methyl-uridin-	262	10.000	15.3 31.7 (Abb.26 B)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Konzentr. (RNase A) (10^{-5} mol/l)	λ_{max} (+) (Diff.Spektr.) (nm)	λ_{max} (-) (Diff.Spektr.) (nm)	Δ E (10^{-2}) (OD) (+)	(OD) (-)
6.1	282	252.5	o.3	3.7
6.1	282	253	o.6	5.5
6.1	282	253	o.9	7.2
6.1	286	258	o.5	3.6
6.1	287	258	o.9	4.8
6.1	287	258	1.o	7.4
6.7	291	262.5	o.6	2.6
6.8	3o2	27o	1.o	4.6
6.7	3o2	27o	1.o	5.o
6.8	312	274	o.7	3.2
6.7	3o7	273	o.4	3.9
6.7	3o6	273	o.6	5.7
6.7	3o7	274	o.6	7.o
6.1	245.5, 298	28o	o.5, o.o	2.6
6.1	245.5, 298	281	o.6, o.o	4.3
6.4	28o	252,5	3.6	4.4
6.4	281	253	3.9	7.1
6.o	331.5	291	1.8	1.6
6.o	331	29o	3.2	1.8
6.o	331	291	3.2	2.2
6.1	36o	322.5	1.6	4.7
6.1	319 (28o)	268, 299	o.9	1.9,2.1
6.1	319 (28o)	268, 299	o.6	o.7,1.3
6.1	319 (28o)	268, 299	1.3	3.5,5.3
6.8	28o	253	1.2	1.1
6.1	-	-	-	-
6.8	287	257	2.3	3.8
6.8	287	257	3.3	5.9
6.3	272	254	o.2	1.5
6.3	272	254	o.2	1.5

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Verbindung (+)	λ_{max} (nm)	ϵ		Konzentration (Nucleotid) (10^{-5} mol/l)	
16.) 3-Hydroxy-äthyl-uridin-	262	10.000		13.5	
17.) 3'-Uridin-di-thiophosphat	262	10.000		7.3 14.7	
18.) 6-Aza-uridin-	265	7.080	108)	11.4 22.9	(Abb.15 B)
19.) 5-Methyl-6-aza-uridin-	262	7.080		11.0	(Abb.15 A)
20.) 2'-Cytidin-phosphat	271	9.100	98)	8.1	(Abb.12 A)
21.) 3'-Cytidin-phosphat	271	9.100	98)	8.1	(Abb.12 B)
22.) Dimethylamino-cytidin-	277	14.100	109)	5.6 11.2	(Abb.12 E)
23.) Cytidin-N-oxid- (DMG)	277	5.500	94)	11.2 22.4	(Abb.12 C)
24.) Cytidin-2'-O-Methyl- 3'-	271	9.100		15.7	
25.) deoxy-Cytidylyl (3'-5')-deoxy-Cytidin	271	18.000		6.5	
26.) Thymidin- (DMG)	267	9.650	98)	8.5 17.4	(Abb.14 D)
27.) Thymidylsäure-benzylester (3')	267	9.800		15.3	
28.) 1-ribo-Pyridon-(2)-	300	5.850	110)	30.0	
29.) 1-ribo-Pyridazon-(2)-	286	4.040	110)	33.0	
30.) Uridin-2'(3')-phosphit	262	10.000	98)	17.9	
31.) Adenosin-2'(3')-phosphit	257	14.600	98)	10.0	
32.) Guanosin-2'(3') phosphit	253	13.600	111)	13.0	
33.) Adenosin-	257	14.600	111)	12.7	(Abb.22 B)
34.) 2'-Adenosin-	257	14.600	111)	5.0 10.0	(Abb.22 C)
35.) 3'-Adenosin-	257	14.600	111)	11.2	(Abb.22 F)
36.) AICARp	267	12.700	112)	12.2	(Abb.24 A)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Konzentration { RNase A) { 10^{-5} mol/l)	λ_{max} (+) (Diff.Spektrum) (nm)	λ_{max} (-) (Diff.Spektrum) (nm)	Δ E (10^{-2}) (OD) (+)	(OD) (-)
6.4	-	-	-	-
6.8	28o	253	o.4	2.9
6.8	28o	253	o.8	4.4
6.2	293	255	o.6	1.1
6.2	293	255	o.6	3.o
6.4	292	255	o.8	3.1
6.4	292	255	1.4	4.o
6.2	287	26o,293	o.4	5.7,o.8
6.2	-	26o, 292	-	5.2,o.8
6.1	3oo	272	o.3	1.o
6.1	3o1	272	o.4	2.4
5.9	32o	265	2.o	4.8
5.9	318	265	3.2	5.9
6.8	-	-	-	-
6.3	-	-	-	-
5.9	289	257.5	o.8	2.8
5.9	288	257	1.6	2.9
6.1	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-
6.3	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-
6.1	277	252	o.7	3.5
6.o	275	252	o.4	1.3
6.o	278	252	1.2	3.2
6.o	28o	256.5	o.5	1.9
6.1	283	259	o.4	2.2

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Verbindung (+)	λ_{max} (nm)	ϵ	Konzentration (Nucleotid) (10^{-5} mol/l)
37.) Adenosin-3'-methanphosphonat	257	14.600 [98]	7.1 13.3
38.) 8-Oxo-adenosin-	268	10.380 [36]	11.0 (Abb. 21 B) 22.0
39.) N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-	268	10.300	9.0
40.) Iso-guanosin-	247,292	11.000 [137]	4.7 (Abb. 21 D)
41.) 8-Brom-guanosin	261	15.500 [36]	12.6 (Abb. 21 C)
42.) 8-Thiomethyl-guanosin-	272	16.900 [36]	11.0 (Abb. 24 B)
43.) 8-Thio-guanosin-	285	19.500 [36]	9.5 (Abb. 20 B)
44.) 8-Oxo-guanosin	248,293	9.700 [37]	12.0
45.) 8-Oxo-guanosin-	248,293	9.700 [37]	16.9 (Abb. 20 C) 8.0
46.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-	248,292	9.700	6.8 13.6 (Abb. 20 A)
47.) N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-	248,293	9.700	11.0 (Abb. 20 D)
48.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-	248, 293	9.700	19.2
49.) 1-(ß-D-ribofuranosyl)benzimidazolon-(2)-	276	5.320 [75]	14.3 (Abb. 21 A) 28.7
50.) N^9-Harnsäure-ribosid-	236,293	11.300 [36]	6.7 (Abb. 19 D)
51.) N^3-Harnsäure-ribosid- (pH 5.0)	289	12.400	12.4 (Abb. 19 B)
52.) N^3-Harnsäure-ribosid- (pH 5.6)	291	13.100	5.9 (Abb. 19 A)
53.) N^3-Harnsäure-ribosid- (pH 7.0)	233,298	17.700 [74]	7.7 (Abb. 19 C)
54.) N^1_3,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäure-ribosid	298	17.000	9.0
55.) beta-L-Adenosin-	257	14.600	12.2 (Abb. 22 E)
56.) beta-L-Cytidin-	271	9.100	20.0 (Abb. 12 D)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Konzentration (RNase A) (10^{-5} mol/l)	λ_{max} (+) (Diff.Spektrum) (nm)	λ_{max} (-) (Diff.Spektrum) (nm)	Δ E (10^{-2}) (OD) (+)	(-)
6.1	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-
6.1	287	267	o.1	2.o
6.1	287	267	o.2	3.o
6.1	-	-	-	-
6.4	271	249,297	2.o	1.2,3.1
6.7	29o	25o	o.2	4.8
6.8	3o4	26o	o.4	2.5
6.1	328	296	o.2	1.1
6.7	-	-	-	-
6.1	26o,312	238,291	1.o,o.6	4,5,6.3
6.7	261	237,29o	o.3	4.4,3.1
6.6	258,31o	285	- ,-	2.3
	258,31o	285	1.3,o.2	2.3
5.7	25o,3oo	275	4.o,2.o	o.1
6.4	-	-	-	-
6.4	28o,287	268	2.6,6.5	o.7
6.4	28o,287	268	2.6,6.5	o.7
7.7	25o,3o8	288	2.1,1.o	5.4
7.7	248,3o4	278	1.2,1.7	2.o
6.6	25o,3o7	28o	o.1,2.3	3.o
7.3	25o,3o5	278	o.4,1.9	o.7
6.4	-	-	-	-
6.1	278	252	1.3	2.2
6.1	29o	263	o.2	1.1

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Verbindung(+)	λ_{max} (nm)	ϵ	Konzentration (Nucleotid) (10^{-5}mol/l)	
57.) beta-L-lyxo-furanosyl-Uracil-	262	10.000	16.5	
58.) beta-D-lyxo-furanosyl-Uracil-	262	10.000	21.0	
59.) alpha-D-lyxo-furanosyl-Thymin-	267	9.800	13.5	
60.) alpha-L-lyxo-furanosyl-Adenin-	257	14.600	12.7	
61.) alpha-D-lyxo-furanosyl-Adenin-	257	14.600	11.4	
62.) beta-L-ribo-pyranosyl-Thymin-2'(4')-phosphat	267	9.800	8.4 16.4	(Abb. 25 D)
63.) beta-D-ribo-pyranosyl-Thymin-2'(4')-phosphat	267	9.800	6.7 13.4	(Abb. 25 C)
64.) alpha-L-ribo-pyranosyl-Thymin-2'(4')-phosphat	267	9.800	7.8	(Abb.25 B)
65.) alpha-D-ribo-pyranosyl-Thymin-2'(4')-phosphat	267	9.800	14.0	
66.) 5'-Phospho-deoxy-Cytidylyl-(3'-5')-deoxy-Cytidin	270	18.000	4.6	

(+) Bei den Substanzen handelt es sich, wenn nicht anders in der Tabelle vermerkt, um die 2'(3')-isomeren Phosphorsäuremonoester. Die in der Tabelle angegebenen molaren Extinktionswerte beziehen sich auf die entsprechenden Nucleoside. Phosphorylierung der Nucleoside ändert die molaren Extinktions-

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Konzentration RNase A) 10^{-5} mol/l)	λ_{max} (+) (Diff. Spektrum) (nm)	λ_{max} (-) (Diff.Spektrum) (nm)	Δ E (10^{-2}) (OD) (+)	(-)
6.4	-	-	-	-
6.7	-	-	-	-
6.8	-	-	-	-
6.8	279	255	1.6	4.3
6.8	278	252	1.7	2.4
6.8	282	258	o.1	o.9
6.8	282	258	o.1	1.6
6.8	286	258	o.1	1.6
6.8	286	258	o.1	2.o
7.7	286	255	1.1	3.6
6.2	-	-	-	-
6.o	-	268,293	-	3.7,2.3

werte nur weniger als 3 % [111]. Für die methylierten Verbindungen wurden die gleichen Extinktionswerte wie für die nichtmethylierten angenommen. Wenn nicht anders in der Tabelle vermerkt, wurden die Messungen in o.o2 M Natriumacetat-Puffer pH 5.6 ausgeführt.

a) Ergebnisse der Differenzspektroskopie.

Das Auftreten der Differenzspektren wurde zuerst von J. P. HUMMEL et al.[12] bei der Bindung von Pyrimidinnucleosid-phosphaten an das Enzym beobachtet.

2'-Cytidin-phosphat zeigt im Differenzspektrum bei 287 nm einen kleinen positiven Peak und bei 26o nm einen starken negativen Peak (Abb. 12 A). Bei Cytidin-3'-phosphat ist der negative Peak weniger stark ausgeprägt und der Peak bei 287 nm geht nicht mehr über die Grundlinie (Abb. 12 B). D. G. ANDERSON et al.[15] hatten festgestellt, dass diese quantitativen Unterschiede mit der Stabilität des Komplexes, gemessen durch Bindungs- oder Inhibitorkonstante, parallel laufen.

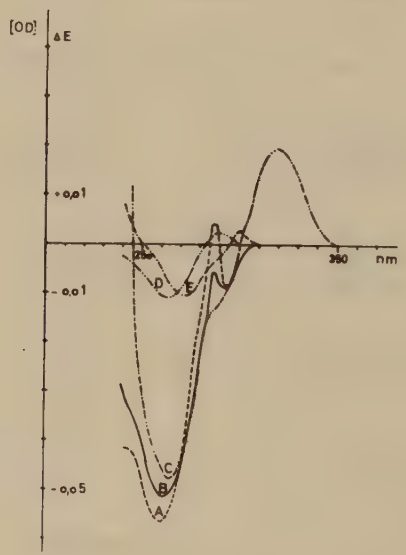


Abb. 12. A: Cytidin-2'-phosphat, B: Cytidin-3'-phosphat, C: Cytidin-N-oxid-2'(3')-phosphat, D: beta-L-Cytidin-2'(3')-phosphat, E: N.N-Dimethyl-Cytidin-2'(3')-phosphat. Versuchsbedingungen: s. Tabelle 3

Findet man bei Vergleich der Substanzen bei gleicher Konzentration ein weniger ausgeprägtes Differenzspektrum, so kann durch Erhöhung der Konzentration an Nuc-

leosid-phosphat festgestellt werden, ob diese geringere Ausprägung auf einem weniger stabilen Komplex beruht oder ob nach Sättigung des Enzyms mit dem Nucleosid-phosphat tatsächlich ein geringerer Einfluss auf den Chromophor ausgeübt wird.

Eine ähnliche Form des Differenzspektrums findet man bei Uridin-2'(3')-phosphat, jedoch liegen hier die Extrema bei 253 nm für den negativen und bei 282 nm für den positiven Peak. Diese Verschiebung entspricht derjenigen des Maximums im UV-Spektrum. Damit scheidet eine durch das Protein bedingte konstante Komponente für das Differenzspektrum aus.

Eine Erklärung für das Auftreten von Differenzspektren ist von M. IRIE [14] zu geben versucht worden. Diese geht davon aus, dass ein Hypochromie-Effekt und eine Rotverschiebung sich überlagern. Die Hypochromie soll durch die Wechselwirkung der Base und einer aromatischen Aminosäure (Phe 12o) des Enzyms bedingt werden, ähnlich wie sie beim " base stacking "-Effekt zwischen den beiden Nucleotidbasen eine Dinucleosid-phosphates bekannt ist [95]. Die Rotverschiebung wird dadurch erklärt, dass die Base sich nach der Bindung an das Enzym in einer Umgebung befindet, die einen höheren Brechungsindex besitzen soll als die wässrige Lösung. Im wesentlichen sollen dadurch die pi - pi*-Übergänge betroffen sein.

Zu einer völlig anderen Interpretation für das Auftreten von Differenzspektren kamen B. R. RABIN et al.[23], die zunächst beobachtet hatten, dass ähnliche Differenzen in den Spektren von Uridin in der protonierten Neutralform und der deprotonierten Form bestehen. Die Übertragung dieses Effektes auf Cytidinderivate zeigt jedoch schon grosse Unterschiede zu den Differenzspektren, die bei der Bindung des Nucleosid-phosphates an das Enzym erhalten werden.

Sie schlossen daraus, dass die Differenzspektren durch eine Verschiebung der Absorptionsbanden infolge einer Deprotonierung durch basische Gruppen am Enzym verursacht werden. Der Effekt einer Deprotonierung soll durch Wasserstoffbrücken an das Enzym erreicht werden. Nucleosid-

phosphate mit Basen, die keine Protonen-Donatoren sein können, sind zur Bestätigung dieser Hypothese nicht untersucht worden.

In den Differenzspektren der Purin-nucleosid-phosphate wurde von diesen Autoren eine Ähnlichkeit mit der Veränderung gesehen, die bei der Protonierung dieser Verbindungen auftreten. Hieraus wurde gefolgert, dass die Purinbasen zunächst anders gebunden werden wie die Pyrimidinbasen und dass die Bindung an das Enzym durch eine protonierende Gruppe des Enzyms zum N^7-Stickstoff des Purinringes hergestellt wird.

In dieser Form der Wechselwirkung sollen neben den pi - pi^*-Übergängen auch die im längerwelligen Bereich liegenden n - pi^*-Übergänge betroffen sein.

Auch diese Hypothese sollte sich durch Untersuchungen von modifizierten Nucleosid-phosphaten prüfen lassen.

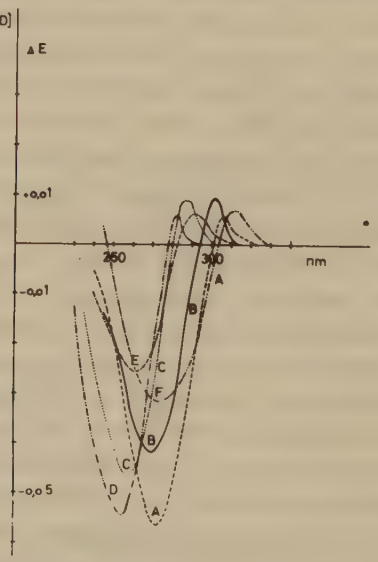


Abb. 13. A: 5-Hydroxy-uridin-, B: 5-Brom-uridin-, C: 5-Methyl-uridin-, D: Uridin-, E: 5-Fluor-uridin-, F: 5-Jod-uridin-2'(3')-phosphat.

Abb. 13 zeigt die Differenzspektren von in 5-Stellung substituierten Uridin-2'(3')-phosphaten. Die grösste

Differenz der Extinktion dieser Verbindungen liegt im Bereich von 7 - 12 nm unterhalb des entsprechenden Absorptionsmaximums. Der positive Peak liegt ungefähr 2o bis 25 nm oberhalb der jeweiligen Absorptionsmaxima.

Die Substitution in der 5-Stellung hat innerhalb dieser Serie keine Auswirkung auf die Bindung der Base an das Enzym. Das Dithiophosphat des Uridins, das von dem Enzym genauso wie das Uridin-2'(3')-phosphat gebunden wird, und genauso die enzymatische Reaktion hemmt, zeigt auch ein gleiches Differenzspektrum wie dieses.

Uridin-2'(3')-phosphit zeigt dagegen kein Differenzspektrum, obwohl hier die Base, Ribose und eine negative Ladung der Phosphitgruppe in gleicher sterischer Anordnung vorliegen wie bei den Phosphaten.

Hieraus ist zu schliessen, dass ohne die primäre dianionische Bindung der Phosphatgruppe keine Wechselwirkung der Base mit dem Enzym erfolgt. Das gleiche findet man bei dem monoanionischen 3'-Thymidylsäurebenzylester und beim deoxy-Cytidylyl-(3'-5')-deoxy-Cytidin, die ebenfalls keine Differenzspektren zeigen.

Abb. 14 E zeigt das Differenzspektrum von Thiomethyl-uridin-2'(3')-phosphat, das kein Proton besitz, welches zu basischen Gruppen des Enzyms nach B. R. RABIN et al.[23] in Beziehung treten kann. Es fällt auf, dass die Bande bei 275 nm, die im Absorptionsspektrum als Schulter auftritt durch die Bindung wesentlich stärker hervortritt und im Differenzspektrum bei 268 nm ein Extremum bildet.

Auch das N,N-Dimethyl-cytidin-2'(3')-phosphat (Abb.12 E) das keine Protonen-Donor-Gruppe besitzt, ergibt ein Differenzspektrum, allerdings nur mit einer geringen Differenz der Extinktion bei einem Konzentrationsverhältnis von 1 : 1 mit dem Enzym. Bei Erhöhung der Nucleosidphosphatkonzentration erhält man Differenzen, die in der Grössenordnung der unsubstituierten Verbindung liegen. Dieses bedeutet, dass die Nucleotidbase nicht anders gebunden ist, auch wenn der Komplex mit dem Nucleotid eine geringere Bindungskonstante hat.

6-Aza-uridin-2'(3')-phosphat (Abb. 15 B) sowie 5-Methyl-6-aza-uridin-2'(3')-phosphat (Abb. 15 A) zeigen ein Differenzspektrum, das dem des Uridin-2'(3')-phospha-

tes entspricht, jedoch ist der positive Peak bei 293 nm stärker ausgeprägt.

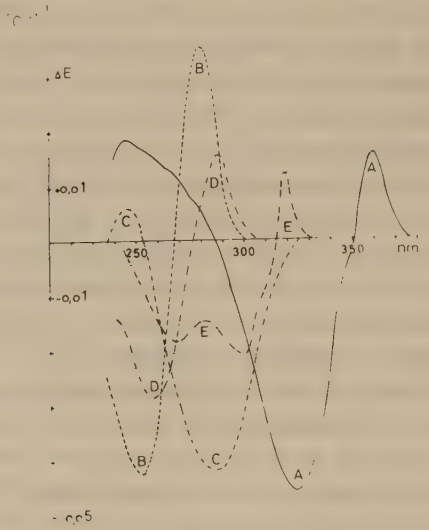


Abb. 14 . A: 4-Thio-uridin-, B: Pseudo-uridin-
C: 5-Dimethylamino-uridin-, D: Thymidin-3'-phosphat, E: 4-Thiomethyl-uridin-2'(3')-phosphat.

Bei Pseudo-uridin-2'(3')-phosphat (Abb. 14 B) wird der positive Peak bei 282 nm höher als bei dem isomeren Uridin-2'(3')-phosphat (Abb. 13 D). Die Lage der Extrema hat sich jedoch gegenüber Uridin-2'(3')-phosphat nicht verändert.

5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert bei 6.45 zeigt in der protonierten Neutralform (in bezug auf die Base) bei 305 nm und in der deprotonierten Form bei 323 und 238 nm ein Absorptionsmaximum (Abb. 16)

Das Differenzspektrum zeigt sowohl für die protonierte als auch für die deprotonierte Form ein ausgeprägtes positives Maximum bei 332 nm und ein negatives bei 290 nm (Abb. 17). Ein weiteres Extremum, das für die protonierte Form im positiven Bereich liegt, erscheint bei 255 nm. Dieses könnte mit der Bande bei 238 nm des UV-

Absorptionsspektrums in Beziehung stehen. Obwohl die UV-Spektren der protonierten und der deprotonierten Form verschieden sind, beeinflusst demnach die Bindung an das Enzym das Differenzspektrum in einer einheitlichen Weise.

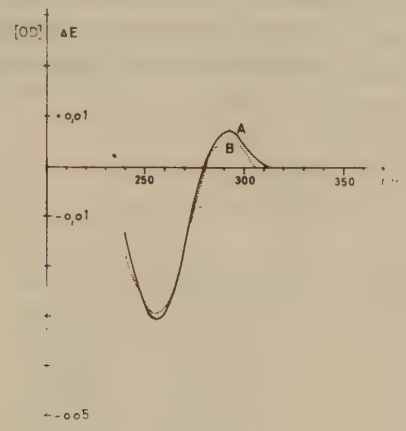


Abb. 15 . A: 5-Methyl-6-Aza-uridin-, B: 6-Aza-uridin-2'(3')-phosphat

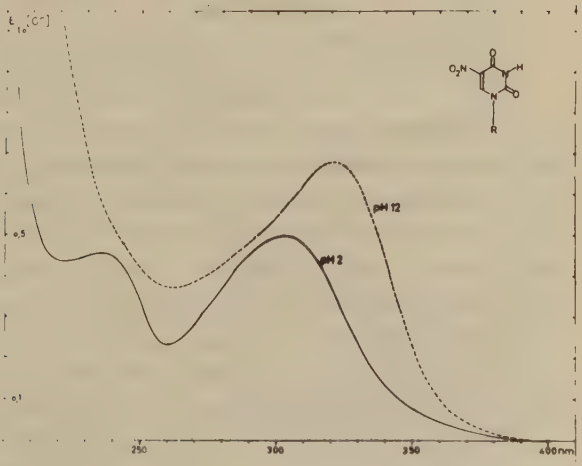


Abb. 16 . UV-Spektrum von 5-Nitro-uridin-2(3')-phosphat.

Würde man eine Bindung der Nucleotidbase zu basischen Gruppen des Enzyms postulieren, so sollte man erwarten, dass die Bindung der anionischen Form wesentlich schwächer sein würde. Bei der Annahme einer Carboxylatgruppe als basischer Gruppe des Enzyms, wie von B. R. RABIN et al.[23] postuliert wurde, sollte man eine Abstossung erwarten. Durch diese Versuche wird die RABIN'sche Konzeption einer Säure-Basen-Beziehung zwischen Nucleotidbase und Enzym ausgeschlossen.

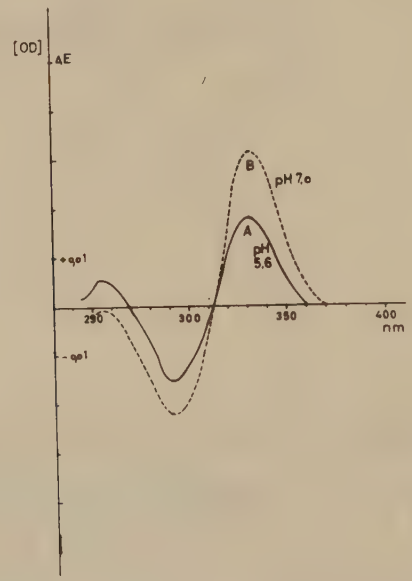


Abb. 17 . A: 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat bei pH 5.6 und B: bei 7.o .

Die Annahme, dass n - π^*-Übergänge durch die Bindung der Base an das Enzym wesentlich beeinflusst werden, scheint ebenfalls nicht haltbar. Abb. 18 zeigt, dass bei Zusatz von Harnstoff ebenfalls Differenzspektren auftreten, die aber bei pH 5 und pH7.6 untereinander grosse Unterschiede aufweisen und sich ausserdem stark von denen unterscheiden, die bei der Bindung des 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphates an das Enzym resultieren. Da dieses Verhalten einem Solvatationseffekt zugeschrieben werden kann, bei dem im wesentlichen die n-Elektro-

nen beeinflusst werden, folgt aus diesen Versuchen, dass bei der Fixierung der Base im wesentlichen die pi - pi^*-Übergänge betroffen sind.

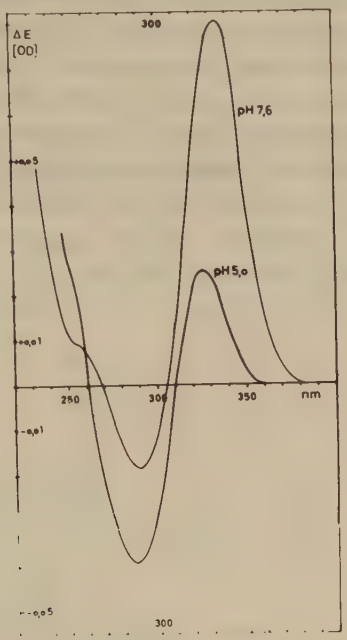


Abb. 18 . Differenzspektren von 5-Nitrouridin bei pH 5.o und pH 7.6 in 5 M Harnstoff (gegen die wässrige Lösung gemessen

Gleichzeitig kann mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die von M. IRIE [14] diskutierte Abhängigkeit der Differenzspektren von dem Brechungsindex bei der Bindung des Nucleosid-phosphates an das Enzym zumindest nicht bedeutend sein kann. Die Harnstofflösung (nach der Durchmischung 5 M) besitzt einen höheren Brechungsindex als die reine wässrige Lösung. Obwohl der Brechungsindex der Lösung nicht so gross ist wie der von M. IRIE [16] geforderte, sollten in beiden Fällen aber gleiche Differenzspektren resultieren, wenn der Brechungsindex allein für eine Rotverschiebung verantwortlich wäre.

Als weiteres Nucleosid-2'(3')-phosphat, das sowohl in der protonierten Neutralform als auch in der deprotonierten Form in bezug auf die Base vorliegen kann, ist das N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert von 6.o [74]. Das UV-Spektrum zeigt zwei Maxima : bei pH 1

288 und 233 nm und bei pH 7 298 nm und 243 (sh) nm. Anders als beim 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat findet man hier unterschiedliche Formen des Differenzspektrums für verschiedene pH-Werte (Abb. 19). Im Gegensatz zu der protonierten- (Abb. 19 A) und teilprotonierten Form (Abb. 19 B) bei pH 5.o und pH 5.6 ist bei pH 7 der positive Peak des Differenzspektrums (Abb. 19 C) grösser als der negative, während die Lage der Extrema für die drei gemessenen pH-Werte nahezu konstant ist.

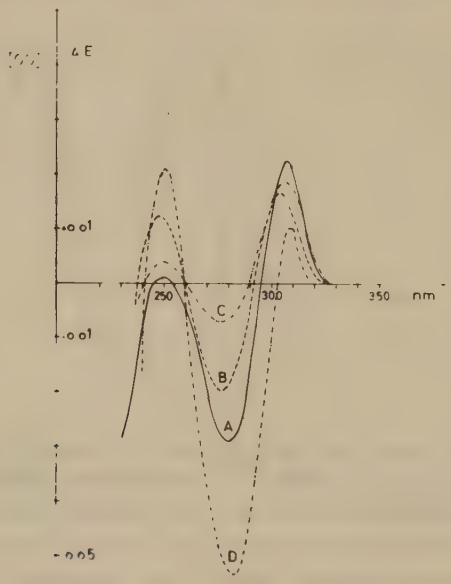


Abb. 19 . N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat. A: pH 5.6, B: 5.o, C: 7.o D: N-9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat.

Während das N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat als 5.6-disubstituiertes Uridin in bezug auf die glycosidische Bindung aufgefasst werden kann, gehört das N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat mit einem pK-Wert von 4.7 (in bezug auf die Base) zu den Purinderivaten und liegt in dem gemessenen pH-Bereich nur als Anion vor. Sowohl die UV-Absorption als auch das Differenzspektrum (Abb. 19 D) zeigt grosse Ähnlichkeit mit dem Absorptions- und Differenzspektrum des N^3-Derivates.

Der negative Peak und der kürzerwellige positive Peak sind gegenüber denen der N^3-Verbindung verstärkt. Die Lage der Extrema ist nahezu die gleiche wie bei dem N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat. Diese beiden Verbindungen zeigen, dass keine Berechtigung für die Annahme von B. R. RABIN et al. [23] besteht, dass Purinnucleosid-phosphate durch saure und Pyrimidin-nucleosid-phosphate durch basische Enzymgruppen unterschiedlich gebunden werden. Es müssten sonst zwischen dem anionischen N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat und dem sowohl in der anionischen als auch in der Neutralform gemessenen N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat grössere Differenzen auftreten.

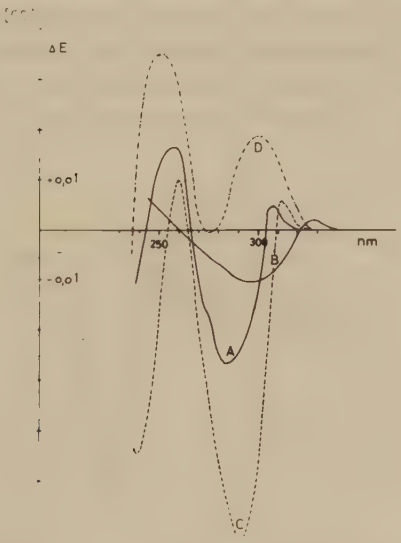


Abb. 2o . A: N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-, B: 8-Thioguanosin-, C: 8-Oxo-guanosin-, D: N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat.

Das 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat besitz an Stelle der C-2-Oxo-gruppe bei den Harnsäurederivaten eine Aminogruppe. Das UV-Spektrum ist ähnlich strukturiert wie das der Harnsäurederivate. Das Differenzspektrum (Abb. 2o C) besitzt ebensolche Ähnlichkeiten mit dem des N^9-Harnsäu-

reribosid-2'(3')-phosphates.

Methylierung in N^1-Stellung vergrössert beim 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat den kürzerwelligen positiven peak im Differenzspektrum (Abb. 2o A),während die Lage der Extrema nahezu die gleiche bleibt. Methylierung in N^7-Stellung vergrössert beide positive Peaks gegenüber dem negativen, der kaum die Null-linie überschreitet (Abb. 2o D). Die N^1,N^7-dimethylierte Verbindung ergibt bei ähnlichen Konzentrationen kein Differenzspektrum mehr. Das N^1,N^7-dimethylierte-N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat zeigt ebenfalls kein Differenzspektrum mehr.

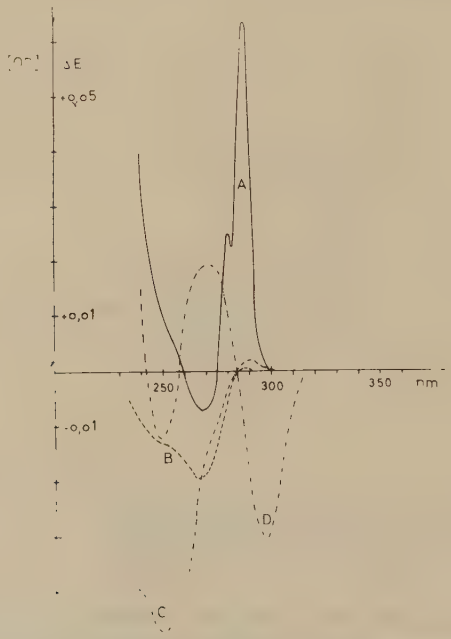


Abb. 21 . A: 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-
B: 8-Oxo-Adenosin-, C: 8-Brom-guanosin-,
D: Iso-guanosin-2'(3')-phosphat.

1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-2'(3')-phosphat (Abb. 21 A) das als 1,3-Di-deaza-8-oxo-purin formal aufgefasst werden kann, zeigt im Differenzspektrum einen ausgeprägten Peak bei 28o und 287 nm.

Der negative Peak bei 268 nm ist nur sehr gering.

8-Brom-guanosin-2'(3')-phosphat (Abb. 21 C) zeigt bei 25o nm ein negatives und bei 291 nm ein positives Extremum.

8-Thioguanosin-2'(3')-phosphat (Abb. 2o B) zeigt in dem Differenzspektrum bei 296 nm einen negativen und bei 328 nm einen positiven Peak.

Das 8-Thiomethyl-guanosin-2'(3')-phosphat (Abb. 24 B) zeigt im Differenzspektrum die Extrema bei 26o nm im negativen und bei 3o3 nm im positiven Bereich. Bei 28o nm zeigt die Kurve eine Schulter.

8-Oxo-Adenosin-2'(3')-phosphat (Abb. 21 B) zeigt bei 268 nm das negative Extremum mit einer Schulter bei 255 nm, die mit der Schulter im UV-Absorptionsspektrum (Abb. 8) in Beziehung zu stehen scheint. Der positive Peak bei 288 nm ist nur gering und ändert sich wie der negative nur wenig bei höheren Konzentrationen.

Das N^7-methylierte Derivat gibt bei gleichen Konzentrationen wie die nichtmethylierte Verbindung kein Differenzspektrum.

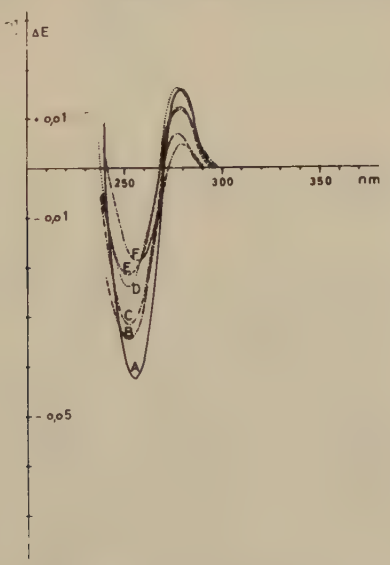


Abb. 22 . A: alpha-L-lyxo-Adenosin-, B: Adenosin-
D: alpha-D-lyxo-Adenosin-, E: beta-L-Adenosin-2'(3')-phosphat, C: Adenosin-2'-,
F: Adenosin-3'-phosphat.

Abb. 22 zeigt die Differenzspektren verschiedener Adenosin-derivate. Mit kleinen Abweichungen zeigen alle Spektren einen gleichen Kurventyp, der im Zusammenhang mit der Konformation der Nucleosid-phosphate besprocnen werden soll.

2-Oxo-adenosin- (= Iso-guanosin-) 2'(3')-phosphat (Abb 21 D) zeigt gegenüber den in Abb 22 gezeigten Adenosin-derivaten ein völlig verschiedenes Differenzspektrum. Das UV-Spektrum (Abb.23) zeigt

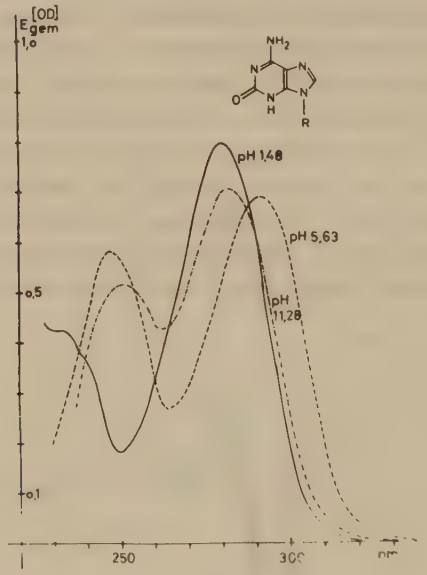


Abb. 23 . UV-Spektrum von Iso-guanosin-2'(3')-phosphat.

ebenfalls keine Ähnlichkeit zu dem des Adenosins. Das Differenzspektrum zeigt bei 298 und 249 nm ein negatives und bei 271 ein positives Extremum.

Wird der Pyrimidinring bei Purinderivaten alkalisch aufgespalten, so erhält man das 1-(beta-D-ribofuranosyl)-5-Amino-imidazol-4-carboxamid-2'(3')-phosphat (AICARp). Das Differenzspektrum zeigt grosse Ähnlichkeit mit dem der Adenosin-derivate (Abb. 24 A).

Alle bisher besprochenen Differenzspektren ergaben sich aus der Wechselwirkung von beta-D-Ribofuranosyl-2'(3')-phosphaten mit dem Enzym. Durch die Bindung der Phosphatgruppe an His 119 und Lys 41 muss für alle diese Verbindungen eine gleiche Lage der Zucker-und Basenkomponente angenommen werden.

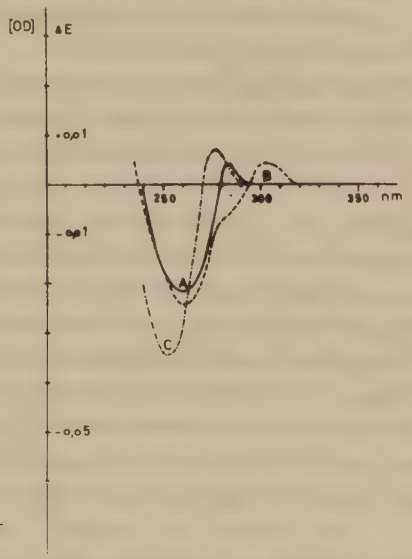


Abb. 24 . A: AICAR-, B: 8-Thiomethyl-guanosin-, C: Adenosin-2'(3')-phosphat.

In der Pyrimidin-Reihe ist am Cytidin-3'-phosphat mit Hilfe der NMR-Spektroskopie der Nachweis erbracht worden, dass die Nucleotidbase mit einer aromatischen Aminosäure in Wechselwirkung stehen muss [17) 18)]. Diese Aminosäure kann aus den Röntgenstrukturuntersuchungen von H. W. WYCKOFF et al.[21)] nur Phenylalanin 12o sein. Mit Hilfe der Differenzspektren von N^3-Harnsäureribosid- und N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat konnte gezeigt werden, dass für die Purine die gleiche Art der Wechselwirkung vorliegen muss, da beide Substanzen nahezu gleiche Differenzspektren liefern.
Eine Wasserstoffbrückenbindung als Ursache der Differenz-

spektren konnte in dieser Arbeit an Hand der Differenzspektren von 4-Thiomethyl-uridin-, N,N-Dimethyl-cytidin- und 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat ausgeschlossen werden. Änderungen des Brechungsindexes und n - pi^*-Wechselwirkungen als hauptsächliche Ursachen der Differenzspektren konnten an Hand der Untersuchungen von 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat bei verschiedenen pH-Werten und 5-Nitro-uridin mit konzentrierten Harnstofflösungen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Als Diskussionsgrundlage für eine Wechselwirkung zwischen den beiden aromatischen Systemen bleibt somit nur eine solche der beiden pi - Systeme in Betracht zu ziehen.

Aus der Annahme einer solchen Wechselwirkung sollte zunächst das Auftreten der Differenzspektren und dann die Form derselben erklärt werden können. Voraussetzung für eine exakte Beschreibung der Spektren ist das Vorliegen eines 1 : 1 Komplexes, was bei manchen Nucleosid-phosphaten erst durch eine Erhöhung der Konzentration auf das Verhältnis 2 oder 3 : 1 erreicht wird.

An Hand von theoretischen Berechnungen [113] kann gezeigt werden, dass bei Annäherung von zwei aromatischen Ringsystemen, z. B. Uracil und Benzol, auf ca. 3 Å eine Rotverschiebung und eine Hypochromie in dem resultierenden Spektrum im Bereich von 25o bis 32o nm auftreten kann. In einem solchen Komplex sind die Wellenfunktionen der beiden pi-Elektronensysteme nicht mehr getrennt zu betrachten. Durch Linearkombination der Wellenfunktionen erhält man für die beiden längerwelligen Absorptionsbanden des Uracils eine Rotverschiebung und eine Intensitätsabnahme. Im kürzerwelligen Bereich (ca. 2oo nm) tritt der umgekehrte Effekt auf, d. h., eine Intensitätszunahme der Banden und eine Blauverschiebung.

Der negative Kurventeil des Differenzspektrums mit einem Extremum, das bei Pyrimidinderivaten 7 bis 12 nm unterhalb des Absorptionsmaximums auftritt, kann hierdurch ohne weiteres erklärt werden. Durch die Rotverschiebung tritt auch ein kleines positives Maximum oberhalb der maximalen UV-Absorption auf. Einige Pyrimidin-nucleosid-

phosphate zeigen ein wesentlich stärker ausgeprägtes positives Maximum. Die Zunahme des positiven Anteils relativ zum negativen Anteil lässt sich bei den Pyrimidin-derivaten in eine Reihenfolge bringen (zunehmende Intensität): 5-Dimethylamino-uridin-, Uridin-, 5-Halogeno-uridin-, 5-Methyl-uridin, 5-Hydroxy-uridin-, 6-Aza-uridin-, 5-Methyl-6-aza-uridin-, Orotidin-, Pseudo-uridin-, 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat.

Zu den Faktoren, die diese Reihe bestimmen, gehört zweifellos einmal die Polarisierbarkeit des Ringsystems. Ein Hinweis dafür könnte auch die Tatsache sein, dass bei 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Pyridon-(2)- und 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Pyridazon-(2)-2'(3')-phosphat praktisch kein Differenzspektrum zu beobachten ist, obwohl in diesen beiden Fällen das Enzym mit Sicherheit gesättigt ist und die Base auf dem Phe 12o aufliegen muss.

Andererseits könnten durch Substituenteneinflüsse die Vektoren für die Übergänge geändert werden. Für das Uracil wird die längerwellige Bande bei 26o nm einem B_{2u}-Übergang zugeordnet, deren Vektor von C-4=O nach C-2=O verläuft [97]. Für die hier gemessenen substituierten Verbindungen sind noch keine diesbezüglichen Überlegungen diskutiert worden.

Bei den Purinen ist eine Interpretation noch schwieriger. Vergleicht man bei den Purin-derivaten den ersten, längerwelligen Peak mit dem negativen Extremum, dann ergibt sich für diese 2'(3')-Phosphate folgende Reihenfolge (abnehmendes Verhältnis von positivem zu negativem Extremum): 1-(beta-D-ribofuranosyl)-Benzimidazolon-(2)-, N^3-Harnsäureribosid-, N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-, 8-Oxo-guanosin-, N^9-Harnsäureribosid-, N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-, Adenosin-, 5-Amino-imidazol-4-carboxamido-1-beta-D-ribofuranosyl- (AICAR-), 8-Brom-guanosin-, 8-Thio-guanosin-, 8-Thiomethyl-guanosin-, Iso-guanosin-2'(3')-phosphat.

Wenn die Differenzspektren durch die Wechselwirkung der Base mit Phe 12o bedingt sind, so sollten diese gestört oder zumindestens schwächer sein, wenn die Base statt in beta- in alpha-Stellung steht oder wenn statt

Substanzen aus der D-Reihe solche aus der L-Reihe genommen werden. Das analoge gilt für die Lyxo-Reihe, in der nur die Stellung der an C-4'-stehenden Hydroxymethylgruppe sich von der der entsprechenden Ribo-Verbindungen unterscheiden.

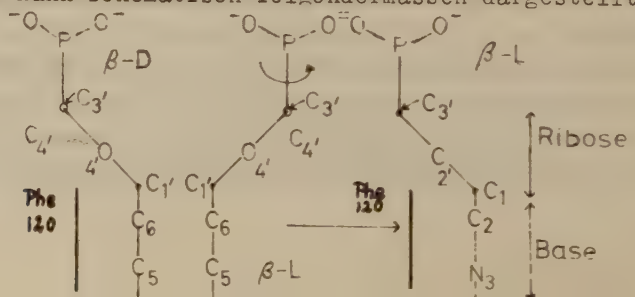
Abb. 22 zeigt die Differenzspektren von Adenin-derivaten bei annähernd gleicher Konzentration. Es fällt auf, dass die Lyxofuranosyl-derivate (Abb. 22 A und D), verglichen mit den Ribo-derivaten, stärkere Extrema aufweisen. Die beta-D-ribo- und alpha-L-lyxo-Derivate zeigen ausgeprägtere Differenzspektren als die entsprechenden chiralen enantiomeren beta-L-ribo- und alpha-D-lyxo-Derivate.

In der Pyrimidinreihe ist der Unterschied wesentlich stärker. beta-L-Cytidin-2'(3')-phosphat (Abb. 12 D) zeigt nur ein geringes Differenzspektrum gegenüber dem des beta-D-Cytidin-2'(3')-phosphates.

In der alpha-D-lyxo-Reihe zeigt das Thyminderivat im Gegensatz zum entsprechenden Adeninderivat kein Differenzspektrum mehr. Die beta-L- und beta-D-lyxofuranosyl-Derivate des Uracils, die in der Ribo-Reihe den alpha-verbindungen (bis auf die Stellung der Hydroxymethylgruppe) gleichen, zeigen ebenfalls bei den Pyrimidinderivaten kein Differenzspektrum mehr. Hier steht die Base, gleiche Bindung des Phosphates an das Enzym vorausgesetzt, zu dem Phenylalanin in einem Winkel von annähernd 110°, d. h., die beiden Aromaten liegen nicht mehr aufeinander.

Für die Bindung der Pyrimidin-ribofuranosyl-phosphate an das Enzym scheint die räumliche Anordnung von Phosphat und Nucleotidbase genau eingehalten werden müssen. Die beta-L-Derivate geben so ein weniger ausgeprägtes Differenzspektrum. Die Bindung des beta-D-Nucleotids an das Enzym kann schematisch folgendermassen dargestellt werden:

(61)



Wenn die beta-L-Derivate gleichermassen gebunden werden, so sollte das Aufeinanderlagern der beiden aromatischen Ringsysteme erschwert werden und dadurch die Fixierung der Nucleotidbase geringer werden.

Eine zweite Art der Bindung ist in diesem Falle ebenfalls denkbar. Dreht man das beta-L-Mononucleotid um eine durch C-3' (bzw. C-2') und P gedachte Achse um 18o°, so erhält man eine ähnliche Gruppierung von Phosphat und Base wie bei den beta-D-ribo-Derivaten. In diesem Falle ist aber der C-2'-Kohlenstoff des Zuckerrings und die C-2-Carbonylgruppe der Base dem Betrachter zugewandt, d. h., die Nucleotidbase liegt gegenüber den beta-D-Derivaten mit ihrer anderen Seite auf dem Phenylalanin.

Welche der beiden Bindungsmöglichkeiten bevorzugt wird, kann mit den hier untersuchten Nucleosid-phosphaten nicht entschieden werden. Methylsubstituenten in 3- oder 5-Stellung können jedoch bei Uridinderivaten eine Entscheidung möglich machen, wie weiter unten im Zusammenhang mit dem Circular-Dichroismus von methylierten Pyrimidinderivaten gezeigt wird. Eine Drehung der Base um 18o° um die Glycosidbindung kommt in Betracht, die aber dann zu einer syn-Konformation führt, die wiederum sich durch das Vorzeichen beim Circular-Dichroismus zu erkennen gäbe. Die Bindung in der " gedrehten " Form könnte vor allem bei den Purinverbindungen eine Rolle spielen, die in der L-Reihe beim Adeninderivat noch ausgeprägte Differenzspektren ergeben.

Abb. 25 zeigt die Differenzspektren von alpha-L- (Abb. 25 B), beta-D- (Abb. 25 C) und beta-L-ribopyranosyl-Thymin-2'(4')-phosphat (Abb. 25 D). Das alpha-D-Derivat ergab kein Differenzspektrum. Im Gegensatz zum beta-D-ribo-Thymin-2'(3')-phosphat (Abb. 25 A) zeigen alle Derivate ein weniger intensives Differenzspektrum. Die Differenzspektren der beiden beta-Derivate der D- und L-Reihe sind dabei besonders schwach ausgeprägt. Die Lage der Extrema variiert nur gering in einem Bereich von ca. 3 nm.

Die Interpretation der Spektren in bezug auf die räumliche Lage der Phosphatgruppe und der Nucleotidbase ist

schwierig. Die Nucleosid-phosphate sind Gemische der 2'- und 4'-Phosphorsäuremonoester. Nach S. ANGYAL [114] liegen die Ribopyranosen in der Sesselform vor und zwar

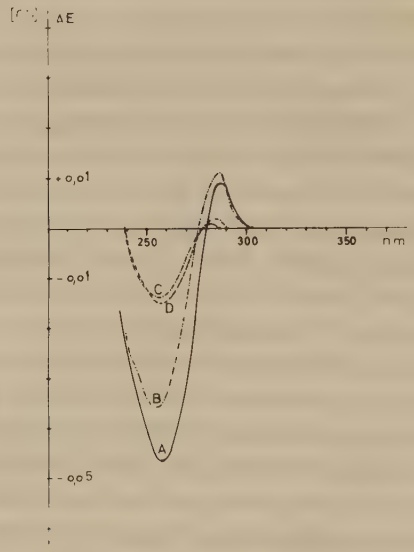
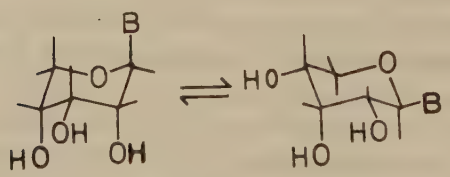


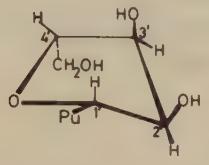
Abb. 25 . A: 5-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat, B: alpha-L-, C: beta-D-, D: beta-L-ribopyranosyl-thymin-2'(4')-phosphat.



1C (62) ⇌ C1 (63)

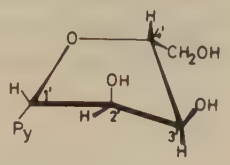
für den unsubstituierten Zucker in nahezu gleichen Teilen in der 1 C- (62) und C 1 - Form (63). Die Energiebarriere zwischen den beiden Konformeren des unsubstituierten Zuckers ist mit o.6 kcal/mol nur gering [114], sie könnte aber durch Substituenten wie die Phosphat-

gruppe oder die verschiedenen Basen so vergrössert werden, dass eine bevorzugte Konformation vorherrschen kann. Das Verhältnis der beiden Konformeren bei den Ribopyranosyl-nucleosid-phosphaten, bzw. die Höhe der Energiebarriere ist nicht bekannt. So sollen hier nur die Ergebnisse festgehalten werden, ohne dass der Versuch einer Erklärung auf sterischer Basis gemacht wird.



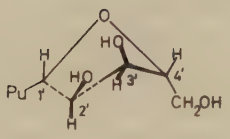
C_2'-endo

(64)



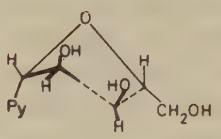
C_3'-endo

(65)



C_2'-endo-C_3'-exo

(66)



C_2'-exo-C_3' endo

(67)

Bei den Ribofuranosyl- und Lyxofuranosylderivaten wurde eine ebene Konformation des Zuckerringes vorausgesetzt, bei der die Substituenten, Pyrimidin- oder Purinbase und Phosphatgruppe für alle Nucleosid-phosphate die gleiche räumliche Anordnung in bezug auf den Zuckerring einnehmen. Aus den NMR-Untersuchungen von C. JARDETZKY [115 - 117] und aus den Röntgenstrukturanalysen von M. SUNDARALINGAM[118] geht hervor, dass der Furanosering nicht ganz eben ist, sondern in einer sog. envelope- oder chair-Form oder in einer verdrillten Form (66 und 67) vorliegen kann. Für die Purinnucleoside der beta-D-Reihe wurde eine unterschiedliche Konformation (C-2'-endo 64) gegenüber den Pyrimidinnucleosiden (C-3'-endo 65) gefordert. Die

Energiebarrieren sind weder bei der unsubstituierten Ribofuranose, noch bei den Nucleosid-phosphaten zwischen diesen Konformeren bekannt. Es könnte möglich sein, dass durch die bevorzugte Ausbildung einer Konformation die Fixierung der Nucleotidbase erleichtert wird. Nimmt die Base eine energetisch begünstigte Lage auf dem Phe 12o ein und trägt so durch diese Wechselwirkung kooperativ zur Stabilität des Komplexes bei, so sollten sich die geringen Energiedifferenzen zwischen den verschiedenen Konformationen des Zuckerrings weniger auf die Lage der Base als auf die Stabilität des Komplexes auswirken.

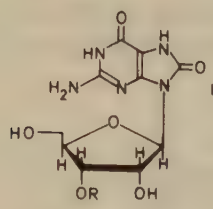
c) Aussagen aus den Untersuchungen zum Circular-Dichroismus.

Nachdem durch die vorhergehenden Untersuchungen die Wechselwirkung der Base mit dem Phe 12o nicht mehr in Zweifel zu ziehen ist, ergeben sich zwei weitere Fragen: Mit welcher Seite liegt die Base, die um die Glycosidbindung frei drehbar ist, dem Benzolring des Phenylalanins auf und liegen beide Ringe genau aufeinander oder sind sie verschoben ?

Die freie Drehbarkeit um die glycosidische Bindung kann durch Substituenten sowohl an der Base als auch an der Ribose gehindert sein, so dass bevorzugte Orientierungen auftreten. Diese werden nach J. DONOHUE und K. N. TRUEBLOOD [119] als " syn " und " anti " bezeichnet (68 - 71).

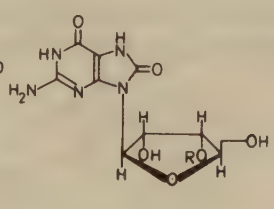
Die Base als Chromophor am asymmetrischen C-1'-Atom des Zuckers bewirkt für jede ihrer Absorptionsbanden einen Cotton-Effekt im messbaren UV-Bereich von 18o bis 35o nm [120]. Das Vorzeichen ist abhängig von der Orientierung der Base und ist für alpha- und beta-Anomere entgegengesetzt. Im allgemeinen ergeben Pyrimidinnucleoside einen positiven und Purinnucleoside einen negativen Cotton-Effekt [121] [122] für die längstwellige Absorptionsbande. Das Vorzeichen wird nicht von der oben beschriebenen unterschiedlichen Konformation des Zuckers

beeinflusst [123]. Es gibt allerdings auch Beispiele, insbesondere cyclo-anhydro-Derivate [122], die diese Regel durchbrechen. Eine befriedigende einheitliche theoretische Erklärung steht zur Zeit noch aus [121] [124].



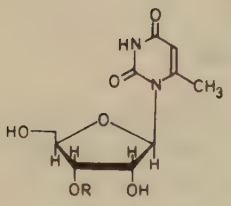
Syn

(68)



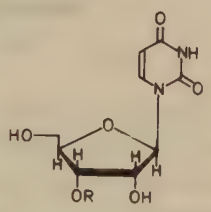
Anti

(69)



Syn

(70)



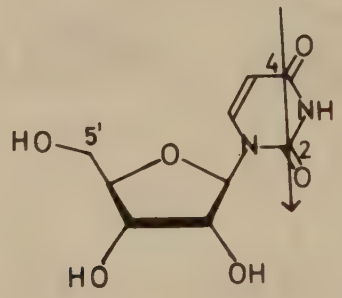
Anti

(71)

Nach T. L. V. ULBRICHT [122] besitzen alle Pyrimidinnucleoside oder -mononucleotide einen positiven Cotton-Effekt, wenn die C-2-Carbonylgruppe der Base der an C-4' befindlichen Hydroxymethylgruppe abgewendet ist, Purinderivate zeigen einen negativen Cottoneffekt, wenn das C-2-Atom der Base der Hydroxymethylgruppe des Riboseringes abgewandt ist. Diese Konformation wird nach J. DONOHUE et al. [119] als " anti " bezeichnet (69 bzw. 71). Voraussetzung hierfür ist eine behinderte Drehung um die glycosidische Bindung. Eine Erklärung für die Umkehr des Vorzeichens beim Übergang von der syn- in die anti-Form wird mit einer Änderung in der Richtung des Schwingungsvektors durch C-4=O und C-2=O bei der Pyrimidinbase gegeben [122] [123] [125] (72).

Nach Definition geht der Vektor von oberhalb der Zuk-

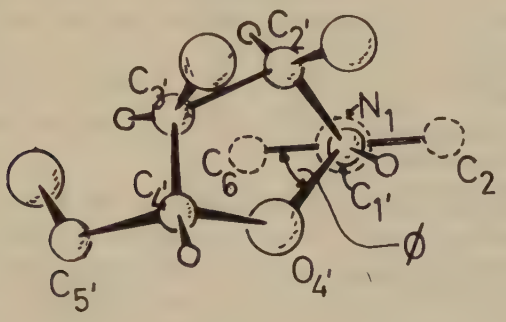
kerebene durch C-4=O nach C-2=O bei positivem Cotton-Effekt (72), wenn diese Richtung nicht durch C-5' geht. Geht der Vektor von C-4=O nach C-2=O durch C-5' oder geht er von unterhalb der Ebene des Zuckers von C-4=O durch C-2=O wie bei alpha-Anomeren oder Pseudouridin, so tritt ein negativer Cotton-Effekt auf, was bei N^1-beta-D-Ribofuranosiden eine syn-Konformation voraussetzt.



(72)

D. W. MILES et al.[126] stellten kürzlich eine verbesserte Bestimmungsregel auf, die es erlaubt, aus den gemessenen Extinktionen bzw. den aus ihnen berechneten Eliptizitäten, zusammen mit dem Vorzeichen des längstwelligen Cotton-Effektes den Torsionswinkel und damit die Orientierung für Pyrimidinnucleoside zu bestimmen. Der Torsionswinkel ϕ (74) wird nach J. DONOHUE und K. N. TRUEBLOOD [119] als der Winkel definiert, der gebildet wird von der Schnittlinie von der Ebene der Base mit der Projektion der O-4'- C-1'-Bindung des Furanoseringes, wenn man in Richtung der C-1'-N-1- Bindung sieht. Dieser Winkel wird als Null definiert, wenn das Sauerstoffatom O-4' des Furanoseringes antiplanar zum Kohlenstoffatom C-2 der Base steht. Das Vorzeichen dieses Winkels ist positiv, wenn die Drehung bei Betrachtung in Richtung der C-1'-N-1-Bindung im Uhrzeigersinne erfolgt. Diese ebenfalls auf empirischen Werten begründete Regel ist für alpha- und beta-Riboside, Arabinoside, Lyxoside und deoxy-Riboside des Uracils und

Cytosins sowie deren Derivate anwendbar (Xyloside sind bisher noch nicht überprüft worden.) Für die Purinribosside fehlt bisher ein solches Schema.



(74)

Unter der Annahme, dass Pyrimidinnucleosid-phosphate mit positivem und Purinnucleosid-phosphate mit negativem Cotton-Effekt die anti-Konformation einnehmen [127], wurden darauf eine Reihe von Nucleosid-phosphaten auf ihre Orientierung hin untersucht.

Tabelle 4

Verbindung	Vorzeichen des Cotton-Effektes	(nm)
1.) Uridin-2':3'-cyclophosphat	+	266
2.) 5-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat	+	272
3.) N^3-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat	+	266
4.) Orotidin-2'(3')-phosphat	+	280
5.) N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat	+	285
6.) 6-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat	-	270

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Verbindung	Vorzeichen des Cotton-Effektes	(nm)
7.) 5.6-Dimethyl-uridin-2'(3')-phosphat	-	275
8.) 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat	±	-
9.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat	±	-
10.) N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat	±	-
11.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat	±	-

Die Tabelle zeigt, dass Pyrimidinnucleosid-phosphate mit zusätzlichen Substituenten in 3- oder 5-Stellung, wie zu erwarten, einen positiven Cotton-Effekt ergeben, d. h., dass sie in Lösung vorwiegend in der anti-Konformation vorliegen.

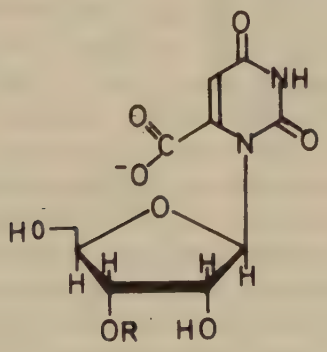
Eine Substitution in 6-Stellung sollte zu einer behinderten Rotation um die glycosidische Bindung Anlass geben und somit auch zu einer bevorzugten Orientierung der Base. Hier zeigt es sich nun, dass die vier in dieser Arbeit untersuchten 6-substituierten Nucleosid-phosphate (N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat soll in diesem Falle als ein 5.6-disubstituiertes Uridinderivat aufgefasst werden) ein unterschiedliches Verhalten zeigen. 6-Methyl- und 5.6-Dimethyl-uridin-2'(3')-phosphat zeigen einen negativen Cotton-Effekt [128] und sollten deshalb in der syn-Konformation vorliegen, während Orotidin- und N^3-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat einen positiven Effekt zeigen und wie die meisten Pyrimidinnucleosid-phosphate in der anti-Konformation vorliegen sollten.

Die Drehwerte für die Natrium-D-Linie zeigen gegenüber den in 6-Stellung nicht substituierten Verbindungen eine

ähnliche Beziehung [129]:

Uridin-3'-phosphat	:	$[\alpha]_D^{22}$: + 22.3° (c 2.o, H_2O) [13o]
Orotidin (73 R=H)	:	$[\alpha]_D^{23}$: + 14.3° (c 1.o, H_2O) [131]
Thymidin	:	$[\alpha]_D^{16}$: + 32.8° (c 1.o4,1-N-NaOH) [132]
6-Methyl-uridin (7o)	:	$[\alpha]_D^{3o}$: - 28.6° (c 1.52, H_2O) [1o6]
5,6-Dimethyl-uridin	:	$[\alpha]_D^{3o}$: - 3o.6° (c 1.47, H_2O) [1o6]

Dieser Befund steht in Einklang mit enzym-kinetischen Messungen, nach denen Orotidin-2':3'-cyclophosphat [32] und N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat [3] Substrate für RNase A sind, während die 6-methylierten Derivate keine enzymatische Hydrolyse zeigen [32]. Für die enzymatische Reaktion ist die anti-Konformation Bedingung.



(73)

Die 6-Methyl-Derivate, die hiernach in der syn-Konformation vorliegen und deren cyclische Diester keine Substrate sind, geben bei höheren Konzentrationen ein geringes Differenzspektrum (Abb. 26 B), das sich nicht durch weitere Konzentrationserhöhung verstärken lässt. Daraus folgt, dass in dieser Form die Base nicht gebunden wird.

Die Frage bleibt hier noch offen, ob die Störung der Bindung durch die Methylgruppe verursacht wird.

Bei den 8-Oxo-purin-nucleosid-phosphaten sollte eine Entscheidung hierzu möglich sein. In wässriger Lösung ergeben sie keinen messbaren Cotton-Effekt für die beiden Absorptionsbanden bei 248 und 293 nm. Das bedeutet, dass sie in wässriger Lösung in keiner bevorzugten Konformation vorliegen, da eine Behinderung der freien Rotation um die glycosidische Bindung nicht vorliegt.

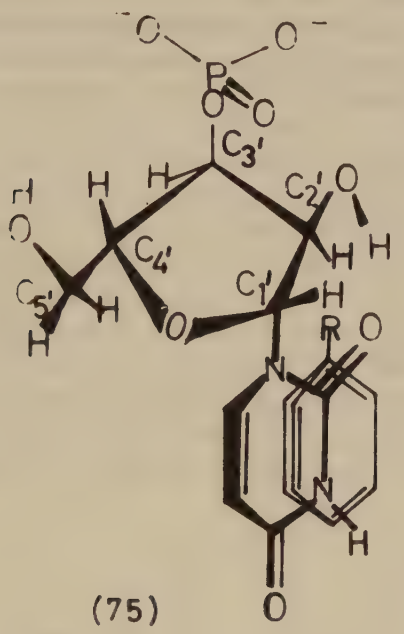
Registriert man das CD- Spektrum einer RNase-Lösung, die selbst einen negativen Cotton-Effekt bei 275 nm zeigt [133], als Nullinie und gibt 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat zu dieser Lösung, so überlagert sich jetzt ein stark negativer Cotton-Effekt im Bereich der Absorptionsbande des Nucleosid-phosphates bei 248 nm und ein schwach positiver bei 295 nm im Bereich der längerwelligen Absorptionsbande.

Hieraus folgt, dass bei der Bindung an das Enzym das 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat in einer Konformation fixiert wird, die im Gegensatz zu unsubstituiertem Guanosin, das in wässriger Lösung in der anti-Konformation vorliegt, die syn-Konformation sein muss.

In dieser Konformation hat der C-8-Sauerstoff eine gleiche Lage wie der C-2-Sauerstoff der Pyrimidin-nucleosid-phosphate. Die Interpretation wird bestätigt durch die Untersuchungen von M. IKEHARA et al.[134] an 8-2'-O-cycloanhydro-Purinderivaten, die ebenfalls für den längerwelligen Cottoneffekt ein positives und für den kürzerwelligen ein negatives Vorzeichen zeigen [135) 136]. Nur in dieser Konformation können 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphate Substrate für das Enzym sein. Bei der in N^1-Stellung methylierten Verbindung ist gegenüber der nichtmethylierten Verbindung kein Unterschied festzustellen.

Das CD-Spektrum der RNase zeigt bei Zugabe von N^7-Methyl-8-oxo-guanosin- und N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat keine neu auftretenden Cotton-Effekte, d. h., die Methylgruppe in N^7-Stellung muss ähnlich wie die Methylgruppe in 6-Stellung beim Uridin-2'(3')-phosphat die Bindung an das Enzym erschweren. Aus den weiter oben erwähnten Befunden folgt andererseits, dass die Bindung nur

in der Konformation erfolgt, in der der Sauerstoff in alpha-Stellung zur glycosidischen Bindung zu dem C-2' der Ribose steht.



(75)

Nachdem weitgehend gesichert ist, dass die Base in der in (75) abgebildeten Weise auf dem Phenylalanin liegt, bleibt die Frage offen, ob beide Ringsysteme direkt aufeinanderliegen oder ob nur eine partielle Überlappung vorliegt.

Methyl- oder Alkylsubstituenten, die grösser sind als die Ausdehnung des aromatischen pi-Systems der Base senkrecht zur Ringebene, sollten eine vollständige Überlappung von Nucleotidbase und Phe 12o behindern.

Bei einer Teilüberlappung sollten sie in solchen Positionen stören, die aufeinanderliegen, während Substituenten in nicht überlappenden Positionen weniger störend in Erscheinung treten sollten.

Es wurden daher die Differenzspektren von 6-Carboxy-uridin- (Orotidin-), 5-Methyl-uridin-, 4-Thiomethyl-uridin-, Dimethylamino-cytidin-, 3-Methyl-uridin-,

3-Hydroxyäthyl-uridin-, 6-Methyl-uridin-, 5.6-Dimethyl-uridin-2'(3')-phosphat aufgezeichnet. 6-Methyl- und 5.6-Dimethyl-uridin-2'(3')-phosphat besitzen einen negativen Cotton-Effekt, der eine syn-Konformation ausweist. Die Positionen 5 und 6 der syn-Konformation entsprechen dadurch den Positionen 3 und 2 des unsubstituierten Uridin-2'(3')-phosphates.

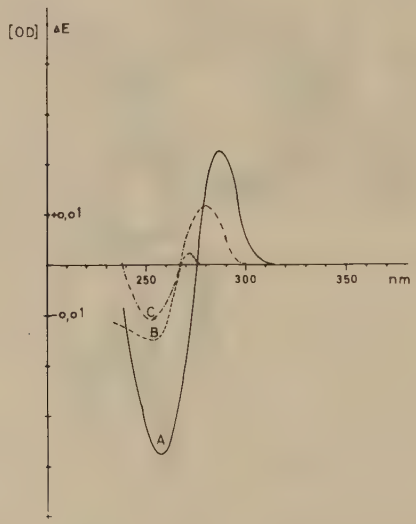


Abb. 26 . A: Orotidin-, B: 3-Methyl-uridin-
C: 6-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat.

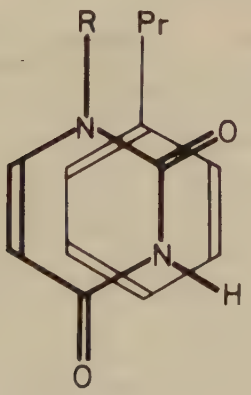
Man sieht, dass Orotidin- (Abb. 26 A), 5-Methyl-uridin- (Abb. 13 C) und 4-Thiomethyl-uridin-2'(3')-phosphat (Abb. 14 E) normale Differenzspektren zeigen, dagegen zeigen Verbindungen mit Methyl- bzw. Alkylsubstituenten in 3-Stellung (N^3-Methyl-, N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2'(3')-phosphat) und in 2-Stellung (6-Methyl-, 5.6-Dimethyl-uridin-2'(3')-phosphat) ein Differenzspektrum nur bei sehr hohen Nucleosid-phosphat-Konzentrationen.
Eine Methylsubstitution in 7-Stellung bei 8-Oxo-purin-Derivaten, die der Methylierung in 3-Stellung bei Pyrimidinen analog ist, bewirkt ebenfalls eine Abschwächung.

Die Methylierung in N^1-Stellung zeigt keinen wesentlichen Effekt.

Es muss hieraus geschlossen werden, dass im wesentlichen die Positionen 2 und 3 bei den Pyrimidinderivaten mit dem Phe 12o überlappen, während die Positionen 5 und 6 nicht überlappt werden. Substitution in Position 4 (Dimethyl-cytidin-, 4-Thiomethyl-uridin-2'(3')-phosphat) beeinträchtigt die Überlappung nur wenig.

Bei den Purin-nucleosid-phosphaten überlappt der Imidazolteil mit den Positionen 7 und 8 das Phenylalanin. Dementsprechend liefert das 5-Amino-imidazol-5-carboxamid-1-beta-D-ribofuranosyl-2'(3')-phosphat ein Differenzspektrum (Abb. 24 A).

Bei den Pyrimidinen wird die Schlussfolgerung durch die Tatsache unterstützt, dass das Cytidin-N-oxid-2'(3')-phosphat mit einem Substituenten gleicher Ausdehnung in der Ringebene wie die Metnylgruppe im N^3-Methyl-uridin-2'(3')-phosphat die Wechselwirkung mit dem Enzym nicht stört.



(76)

Mit diesem Ergebnis kann die Verschiebung des Signals des C-6-Protons der Pyrimidine nach niedrigerem Feld und der Aromaten-Protonen des Phe 12o nach höherem Feld

erklärt werden. Die aromatischen Protonen des Phe 12o liegen im Ringzentrum der Base. Durch das Zusatzfeld des Ringstromes erscheinen die Signale erst bei höherem Feld. Das C-6-Proton der Pyrimidinbase liegt ausserhalb des Überlappungsbereiches der beiden Aromaten und wird von dem Ringstrom in entgegengesetzter Richtung beeinflusst, d. h., das Signal erscneint im NMR-Spektrum bei niedrigerem Feld.

Wenn die Differenzspektren ein Indikator sind nicht nur für die Wechselwirkung zwischen Base und Enzym, sondern auch für einen kooperativen Beitrag der Base zur Stabilität des Komplexes, sollte angenommen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den Differenzspektren und der Hemmung der Reaktion durch Nucleosid-phosphate besteht.

Tabelle 5 zeigt diese Übereinstimmung:

Tabelle 5

Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von Uridin-2':3'-cyclophosphat bei pH 6.2 (25°C).

Inhibitor(+)	Konzentration (10^{-3}mol/l)	Hemmfaktor(++)	Hemmfaktor(+++
1.) Uridin-	1.49	1.o	11.6
2.) 6-Methyl-uridin-	1.3o	5.8	67.5
3.) 3-Methyl-uridin-	1.29	3.5	4o.5
4.) Guanosin	2.22	2.1	24.5
5.) 8-Oxo-Guanosin-	o.54	1.3	15.1
6.) N^7-Methyl-8-Oxo-guanosin-	o.86	3.2	37.3
7.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-	o.97	1.3	15.1
8.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-	1.28	6.7	78.o
9.) 8-Brom-guanosin-	1.o4	4.3	5o.o

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Inhibitor(+)	Konzentration (10^{-3} mol/l)	Hemmfaktor(++)	Hemmfaktor(+++)
10.) 8-Thiomethyl-guanosin-	1.65	1.6	18.6
11.) 8-Thio-guanosin-	0.56	2.8	32.6
12.) Adenosin-	1.46	4.9	57.0
13.) beta-L-Adenosin-	1.89	14.7	171.0
14.) 8-Oxo-adenosin	0.67	1.4	16.3
15.) N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-	1.40	7.0	81.5
16.) Adenosin-3'-methanphosphonat	1.46	8.7	101.0
17.) N^3-Harnsäure-ribosid	0.95	0.4	4.7

(+) Als Inhibitor wurde das 2'(3')-Isomerengemisch der Phosphorsäuremonoester verwandt.

(++) Hemmfaktor bei gleicher Inhibitorkonzentration.

(+++) Hemmfaktor bezogen auf die enzymatische Hydrolyse von Uridin-2':3'-cyclophosphat ohne Inhibitor. Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor = 100.

Die Konzentration an Uridin-2':3'-cyclophosphat betrug in allen Fällen $1{,}56.10^{-3}$ mol/l.

Die methylierten Verbindungen N^3-Methyl-uridin-, 6-Methyl-uridin-, N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-, N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin- und N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-2'(3')-phosphat sind als 2':3'-cyclische Diester keine Substrate und hemmen die enzymatische Hydrolyse des Uridin-2':3'-cyclophosphat weit weniger stark als die nichtmethylierten Derivate. N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat hemmt die Reaktion genauso stark wie die nichtmethylierte Verbindung.

Die Adenosinderivate beta-L-Adenosin-2'(3')-phosphat und

Adenosin-3'-methanphosphonat zeigen eine aktivierende Wirkung, eine Erscheinung, die von H. J. WIEKER und H. WITZEL[138] bei der enzymatischen Hydrolyse von Cytidin-2':3'-cyclophosphat in Gegenwart von Adenin-derivaten gefunden wurde.

D.) Zusammenfassende Diskussion.

Die Nucleotidbase, die allein oder im Nucleosid nicht an die Pankreas-Ribonuclease gebunden wird [12], führt bei den dianionischen Nucleosid-phosphaten zu stabilen Komplexen. Durch Modifizierung der Base kann zunächst eine spezifische Bindung zum Enzym in Form von Wasserstoffbrücken ausgeschlossen werden [3]. Die Bindung der Base an das Enzym geht mit spektralen Änderungen einher, die zu charakteristischen Differenzspektren führen [12].

Die Annahme einer Wechselwirkung zwischen den pi-Systemen einer aromatischen Aminosäure (Phe 12o) und der Nucleotidbase, für die aus NMR-spektroskopischen Daten [17] [18] und der Kristallstrukturanalyse [2o - 22] Anhaltspunkte gegeben waren, kann das Auftreten der Differenzspektren weitgehend erklären. Wie an substituierten Basen, die sowohl als Anion wie auch in der Neutratform gebunden werden, gezeigt werden kann, scheinen n - pi^*-Übergänge nicht oder nur wenig betroffen zu sein.

Die optimale Wechselwirkung ist abhängig von der Stellung der Base zu der primär bindenden Phosphatgruppe, wie bei der Verwendung von enantiomeren und anomeren Nucleosidphosphaten gezeigt werden konnte. Sie ist weiterhin nur optimal, wenn der C-2-Sauerstoff der Pyrimidine bzw. der Imidazolteil der Purine zum C-2' des Zuckerrings steht und nicht zum O-4'. An Hand von Substitutionen in allen fünf Positionen des Pyrimidinringes, die eine Wechselwirkung der beiden pi-Systeme stören können, kann gezeigt werden, dass die beiden aromatischen Systeme sich nicht voll überlappen, sondern nur partiell. Die 2- und 3-Position der Pyrimidinbase liegt auf dem Phenylalanin, während die 4-, 5- und 6-Position sich nicht decken.

Damit zeigt sich, dass 3-Methyl-uridin-2':3'-cyclophosphat und andere neben der katalysierenden Carbonylgruppe der Base alkylierten Verbindungen wegen der gestörten Bindung der Base keine Substrate sind. Dies geht auch aus der verminderten Hemmung hervor, die mit der verminderten Ausbildung der Differenzspektren parallel läuft. Ein Eingriff der Methylgruppe in die katalytische Funktion des C-2-Sauerstoffs kann ausgeschlossen werden.

Für die Reaktion ergibt sich deshalb, dass der C-2-Sauerstoff, der bei den Cyclophosphaten das Wasser aktivieren muss, nur dann seine Funktion erfüllt, wenn er als Teil der Base durch die Wechselwirkung mit dem Phenylalanin 12o fixiert ist. Dies bedeutet, dass die Aktivierungsenergie für die Basenkatalyse im Entropie-Term herabgesetzt wird, analog zu der Beobachtung bei Dinucleosidphosphaten, bei denen durch den " base stacking "-Effekt ebenfalls eine Senkung der Aktivierungsenergie um 2 bis 4 kcal/mol erreicht wird.

Die registrierten Differenzspektren erscheinen geeignet zu sein, theoretische Berechnungen über die Beeinflussung der Lage und Intensität einzelner Banden bei der Wechselwirkung zweier pi-Systeme experimentell zu überprüfen.

E.) Experimenteller Teil.

I.) Allgemeine Arbeitsmethodik.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Substanzen konnten z. T. nur in 1o bis 1oo mg Mengen erhalten werden. Diese Mengen sind für enzymatische Untersuchungen im allgemeinen ausreichend. Um von den Substanzen möglichst wenig zu verlieren, mussten besondere Verfahren sowohl in der Darstellung und Reinigung als auch zur eindeutigen Identifizierung angewandt werden. Bei der Synthese der verschiedenen Nucleosid-phosphate wiederholen sich diese Methoden und auch einige typische Arbeitsvorgänge, die hier als erstes beschrieben werden sollen.

1.) Kontrolle des Reaktionsverlaufs.

Zur vermeidung von Probeansätzen wurde der Reaktionsverlauf ständig kontrolliert.

a) spektroskopische Kontrolle.

Zu bestimmten Zeiten wurden Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und die spektrale Änderung bei verschiedenen pH-Werten gemessen (pH 1, pH 7, pH 13).

b) chromatographische Kontrolle.

Bei Reaktionen, in denen der Chromophor nicht verändert wurde, wurden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen und dünnschicht-chromatographisch (DC-Karten, Riedel) oder elektrophoretisch aufgetrennt. Die Entwicklungszeit der Chromatogramme ist abhängig von dem Fliessmittel und dauert ca. 1o bis 45 min. Diese Methode eignet sich nur für relativ langsam verlaufende Umsetzungen.

2.) Reinigung der Substanzen.

a) papierchromatographische Reinigung.

Reaktionsgemische bis 2oo mg wurden auf Karton (Schleicher & Schüll Nr. 2o71) aufgetragen und absteigend chromatigraphiert. Durch die Anwesenheit heteroaromatischer Verbindungen (Nucleotidbasen) fluoresceiren die in Bändern aufgetrennten Substanzen bei Bestrahlung mit UV-Licht und können auf diese Weise markiert werden. Die Bänder werden ausgeschnitten und mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Papier eluiert. Das Eluat wurde nach Bestimmung der

Extinktion eingeengt und Gefriergetrocknet. Substanzen, die nur als Sirup bei der Gefriertrocknung anfallen werden mit organischen Lösungsmitteln ausgefällt, filtriert oder Zentrifugiert und getrocknet. Kleinere Peaktionsgemische wurden auf leichtere Papiersorten (bis 100 mg: MN 218, bis 400 mg Schleicher & Schüll Nr. 2043 b Mgl.) aufgetragen und wie oben getrennt und isoliert.

b) Ionenaustausch-Chromatographie.

Grössere Substanzmengen wurden auf eine Dowex 1x2 Anionenaustauschersäule (Formiatform) gegeben und mit einem Ameisensäure- oder Ammoniumformiat-gradienten steigender Konzentration fraktionierend eluiert. Nach Bestimmung der Extinktion wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Bei Arbeiten mit Salzgradienten muss vor der Gefriertrocknung das Kation an einem Dowex 50 Kationenaustauscher (H^+- bzw. Pyridinium-form) ausgetauscht werden.

c) Gelfiltration.

Sind in einem Reaktionsgemisch unterschiedlich grosse Moleküle vorhanden, z. B. heteroaromatische Basen, Nucleoside, Nucleosid-phosphate und anorganische Salze, so wurde das Gemisch durch Gelfiltration an Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala) durch Elution mit Wasser getrennt. Die Trennschärfe wurde mit Hilfe einer Durchflussküvette, papierchromatographisch und spektroskopisch kontrolliert. Die identifizierten Fraktionen wurden eingeengt und gefriergetrocknet.

3.) Analytik der Substanzen.

Die klassischen Methoden der Identifizierung und Analyse chemischer Verbindungen lassen sich nur selten anwenden (Schmelzpunkt, Siedepunkt, C-H-N-Analyse usw.). Die hier synthetisierten Substanzen besitzen häufig keinen scharfen Schmelz- oder Zersetzungspunkt. Die C-H-N-Analyse besitzt nur geringen Wert, da bei Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 250 und 600 geringe Verunreinigungen durch ähnliche Verbindungen die Analysenergebnisse nur wenig oder bei Isomeren Verbindungen gar nicht beeinflussen. Oft sind aber solche Isomere starke Hemmstoffe bei der enzymatischen Reaktion. Die für die enzymatischen Untersuchungen benötigten Substanzen wurden durch folgende Methoden auf ihre Reinheit

geprüft bzw. identifiziert.

a) Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie.

Die Rf-Werte der Verbindungen wurden mit Hilfe der absteigenden Papierchromatographie auf Papier Nr. 2o43 b Mgl. (Schleicher & Schüll) oder aufsteigend mit Dünnschichtplatten (CE- und Si F-Platten, Riedel) in folgenden Fliessmitteln bestimmt:

A : Isopropanol:Wasser:2N-Ammoniak = 7 : 2 : 1 (^{v}/v)
B : ges. Ammoniumsulfatlösung:1 N-Natriumacetat: Isopropanol = 8o : 18 : 2 (^{v}/v)
D : Isopropanol:Wasser:konz. Ammoniak = 7 : 2 : 1 (^{v}/v)
E : N,N-Dimethylformamid:konz. Ammoniak:Isopropanol = 1o : 25 : 65 (^{v}/v)
F : Äthanol:1 N-Ammoniumacetat = 5 : 2 (^{v}/v)
G : Chloroform:Methanol = 7 : 3 (^{v}/v)

Die Laufzeit in Fliessmittel A und D beträgt ca. 2o - 24 h, in Fliessmittel B ca. 16 h. Fliessmittel E, F und G wurden für die Dünnschichtchromatographie verwandt.

b) Papierelektrophorese.

Niedervolt-Elektrophorese bei 3oo bis 5oo V .

Lösungsmittel (C) : Boratpuffer o.1M, pH 9.25
Stromstärke : 3 bis 5 mA
Laufzeit : 6 bis 12 h
Papiersorte : Schleicher & Schüll Nr. 2o43a

Unter Standardbedingungen können die Re-Werte, ähnlich wie die Rf-Werte zur Charakteristik einer Substanz herangezogen werden.

c) Nachweis von Nucleosiden auf dem Papierchromatogramm (cis-Diolstruktur).

Das Papierchromatogramm wurde mit einer o.3%igen Lösung von Bleitetraacetat in Eisessig und nach ca. einer Minute Einwirkungsdauer mit einer 3%igen Benzidinlösung in Eisessig besprüht. Die Nucleoside erscheinen als helle Flecken auf blauem Grund. Diese Reaktion wird von anderen Substanzen, die mit Bleitetraacetat reagieren, gestört.

d) Nachweis von Nucleosid-phosphaten (Phosphat-Nachweis)

Das Papierchromatogramm wurde mit einer perchlorsauren

Ammoniummolybdat-lösung besprüht. Durch Bestrahlen mit UV-Licht oder Einwirkung von Sonnenlicht erscheinen phosphorhaltige Substanzen als blaue Flecken auf hellem Untergrund. Eventuell ist das Papier nach dem Besprühen ca. 4 min auf 9o° im Trockenschrank zu erwärmen.
Zusammensetzung des Sprühreagenzes:
5ml 6o%ige Percnlorsäure, lo ml 1-N-Salzsäure, 25 ml 4%ige Ammoniummolybdatlösung mit Wasser auf loo ml aufgefüllt.

e) UV-Spektroskopie.

Eine Lösung der zu untersuchenden Substanz wurde in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke, Hellma QS Nr. lo4) gegeben und im UV-Spektrophotometer (Cary 15, Varian) bei folgenden pH-Werten gemessen.
pH 1 : o.1 N-HCl, pH 7 : Phosphatpuffer, pH 13 : o.1 N-NaOH.

f) IR-Spektroskopie.

Die Substanzen wurden als Film, in Nujol oder als KBr-Pressling mit einem Beckmann-Infracord- oder einem Perkin-Elmer-Spektrometer vermessen.

g) NMR-Spektroskopie.

4 bis 2o mg der Substanzen wurden in o.2 ml D_2O bzw. DMSO-D_6 gelöst und die Spektren mit einem NMR-Spektrometer (Varian A 6o bzw. Varian HA loo) registriert.

h) pH-Werte.

Die pH-Werte wurden mit einer Einstabmesskette (Ingold Typ 4o5) und einem pH-Meter (Radiometer Nr. 25, Kopenhagen) gemessen. Die Eichung erfolgte gegen Standard-Puffer pH 3, pH 4.62 und pH 7.o (Riedel).

i) Qualitative enzymatische Hydrolysen.

Ca. o.5 bis 1.o micromol (5 bis lo OD) wurden in ca. 5o microl. o.1 M-Trispuffer pH 7.o gelöst. Dazu wurden 5o microl. einer Lösung von 2 mg RNase A pro ml Trispuffer pH 7 gegeben und ca. 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschliessend papierchromatographisch getrennt und identifiziert.

k) Qualitative saure Hydrolyse von 2':3'-cyclischen Phosphorsäure-diestern.

Ca. o.5 bis 1.o micromol (5 bis 1o OD) wurden in ca. o.1 ml 5o %iger Essigsäure gelöst und 3 h lang auf 5o°C erwärmt. Nach dem Abdampfen der Essigsäure im Vakuum bei 5o° und Kodestillieren mit Wasser wurde das Gemisch chromatographisch getrennt und identifiziert.

l) CD-Spektroskopie.

Ca. o.1 micromol der Substanz wurde in 2ml o.o2 M Natriumacatat-Puffer pH 6.2 gelöst und das Spektrum mit einem Dichrograph (Société JOUAN) registriert.

4.) Spektrophotometrische Bestimmung von pK-Werten.

Die Substanz (o.2 bis 1.o micromol, ca. o.7 bis 2.o OD) wurde in 2ml Puffer in einer Quarzküvette (Hellma, Nr. 1oo-QS) gelöst und mit 4o %iger NaOH mit Hilfe einer Glaselektrode (Einstabmesskette, Ingold Typ 4o5 , pH-Meter: Radiometer Nr. 25) titriert. Die pH-Intervalle wurden zwischen o.3 und 1.o pH-Einheiten gewählt und für jeden pH-Wert das UV-Spektrum der Lösung mit UV-Spektrometer Cary 15 von 35o bis 23o nm registriert. Die Eichung des pH-Meters erfolgte gegen Standardpuffer (Riedel). Für die Auswertung wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge gegen den pH-Wert aufgetragen. Der Fehler, der durch die Verdünnung bei der Zugabe von Natronlauge entsteht, liegt ausserhalb der Messgenauigkeit und ist zu vernachlässigen. Der für die Messung benutzte Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 3.6 ml 85 %ige Phosphorsäure, 7oo mg Citronensäure und 4oo mg Borsäure wurden mit Wasser auf 25o ml aufgefüllt.

Nach dieser Methode wurden die noch nicht bekannten pK-Werte folgender Nucleoside und Nucleosid-phosphate, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, bestimmt:

Tabelle 6

pK-Werte der Baseneiniger Nucleosid-derivate

Substanz	pK'	pK''
1.) 5-Fluor-uridin	7.48 (±o.o5)	-

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Substanz	pK'	pK'' (pK''')
2.) 5-Hydroxy-uridin	7.55 (± o.o5)	
3.) 5-Nitro-uridin	6.4o (± o.o5)	
4.) 5-Dimethylamino-uridin	3.45 (± o.o5)	9.5o (± o.o5)
5.) Orotidin		9.22 (± o.o5)
6.) 8-Brom-guanosin		8.9o (± o.o5)
7.) 8-Thiomethyl-guanosin		9.15 (± o.o5)
8.) Iso-guanosin	3.4o (± o.o5)	9.65 (± o.o5)
9.) 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat		8.6o (± o.o5) 11.6o (± o.o5)
1o.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin		9.9o (± o.o5)
11.) N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat		8.75 (± o.o5)
12.) 8-Oxo-adenosin-2'(3')-phosphat	2.9o (± o.o5)	8.5o (± o.o5)
13.) N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-2'(3')-phosphat	2.7o (± o.o5)	
14.) N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat	4.7o (± o.o5)	1o.2o (± o.o5)

5.) Differenzspekroskopie.

Die Differenzspektren wurden mit dem UV-Spektrometer Cary 15 gemessen. Als Küvetten dienten Tandem Küvetten (Hellma, Nr. 238 QS 45 x 12,5 x 12,5 mm, je 4,375 mm Schichttiefe). Im wesentlichen wurde die Methode von J. P. HUMMEL et al.[12] angewandt. Danach befinden sich im Referenzkanal Ribonucleaselösung und Substratlösung getrennt in je einer Kammer. Im Probenkanal werden nach Aufnahme der Grundlinie die beiden Lösungen durchmischt und das Differenzspektrum nach der Durchmischung aufgenommen. Für die Untersuchungen wurden o.o2 M Natriumacetatpuffer pH 5.6, o.1 M DMG-Puffer 5.6 und o.o2 M Natriumacetatpuffer pH 7.o verwandt. Die Konzentration der RNase betrug ca. 6 bis 7 x $1o^{-5}$ mol/l und wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Nucleosid-phosphatkonzentration wur-

de zwischen 4 x 10^{-5} und 3 x 10^{-4} mol/l gewählt und ebenfalls spektrophotometrisch bestimmt. Die Differenzspektren wurden im Bereich von 380 bis 235 nm aufgezeichnet.

6.) Reaktionen unter pH-stat-Bedingungen.

Um grössere Mengen an Fremdionen, die bei der Verwendung von Puffern auftreten, zu vermeiden, wurden Reaktionen, die bei konstantem pH-Wert verlaufen sollten mit Hilfe eines pH-stat-Gerätes (Radiometer, Titrigraph Type SBR 2c, Titrator Type TTT 1c, Scale Expander Type PHA 630Ta) ausgeführt.

7.) Inhibierung der enzymatischen Reaktion.

Zu 2 ml einer 0.2 M Kochsalzlösung wurde mit einer Mikrometerspritze eine Lösung von Uridin-2':3'-cyclophosphat gegeben. Zu dieser Lösung wird das Nucleosid-2'(3')-phosphat, ebenfalls in 0.2 M NaCL-Lösung , gegeben und anschliessend die resultierende Lösung auf pH 6.2 gebracht. Anschliessend wurde eine RNase-Lösung, die ebenfalls auf pH 6.2 gebracht worden war zu der Nucleosid-phosphatlösung gegeben und der Verbrauch an 0.2 M NaOH-Lösung mit dem pH-stat-Gerät gegen die Zeit registriert. Die Konzentrationen der Lösungen wurden spektrophotometrisch bestimmt. Das Titriergefäss wurde auf 25°C thermostatisiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inhibierung wurde ermittelt aus der Abnahme der Uridin-2':3'-cyclophosphat-Konzentration, welche aus dem NaOH-Verbrauch, der gegen die Zeit auf halblogarithmischem Papier aufgetragen worden war, ermittelt wurde.

8.) Herkunft der verwendeten Reagentien:

Benzimidazolon-(2) : EGA-Chemie, Steinheim
Phenylglyoxal : EGA-Chemie, Steinheim
Dicyclohexyl-carbodiimid : EGA-Chemie, Steinheim
N,N-Dimethylformamid-dimethyl-acetal : EGA-Chemie, Steinheim
N,N-Dimethylformamid-äthylen-acetal : EGA-Chemie, Steinheim
p-Anisyldiphenylchlormethan : EGA-Chemie, Steinheim
1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat : Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee
Triäthylphosphit : Schuchardt, München
Hexachloroaceton : Schuchardt, München
Tributylamin : Riedel-deHaën, Seelze

Quecksilber-(II)-bromid : Riedel-deHaën, Seelze
Chlorameisensäureäthylester : Schuchardt, München
Celite 535 : Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Dowex-Ionenaustauscher : Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Sephadex G-lo : Deutsche Pharmacia (Frankfurt)
Molekularsieb, 3Å, 2mm ϕ : Merck, Darmstadt
Deuteriumoxid : Merck, Darmstadt
Hexadeuterodimethylsulfoxid : Merck, Darmstadt
Adenosin-2'(3')-phosphat : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
Guanosin-2'(3')-phosphat : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
Uridin-2'(3')-phosphat : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
Guanosin : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
Uridin : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
8-Brom-guanosin : Zellstoffwerke Waldhof, Mannheim
Pankreas-Ribonuclease : Hormon-Chemie, München
Saure Phosphatase : Koch-Light,Colnbrook Bucks.

HCl-DMF-Lösung :
Unter Eiskühlung wurde trockener Chlorwasserstoff in wasserfreies N,N-Dimethylformamid bis zur Sättigung eingeleitet. Die Lösung wird in gut verschlossenem Kolben im Kühlschrank aufbewahrt.

beta-Cyanoäthylphosphat :
wurde nach G. M. TENER [72] dargestellt.

5-Nitro-uridin
wurde nach I. Wempen et al. [71] dargestellt.

N^3-Methyl-uridin-2':3'-phosphat
wurde nach W. Szer und D. Shugar [27] dargestellt.

Die im anschliessenden experimentellen Teil nicht aufgeführten Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. A. Holý, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prag und von Herrn Dr. F. Eckstein (Uridin-3'-dithio-phosphat) MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

9.) Lösungsmittel.
Pyridin wurde über KOH vorgetrocknet, destilliert und über Calciumhydrid bzw. Molekularsieb aufbewahrt.
Benzol, Toluol, Xylol und Diäthyläther wurden über Natrium

getrocknet und über Molekularsieb aufbewahrt.

N,N-Dimethylformamid wurde azeotrop gereinigt und getrocknet und über Molekularsieb aufbewahrt.

Methanol, Äthanol wurden über das entsprechende Magnesiumalkoholat getrocknet.

II.) Darstellung der Substanzen.

Die mit $^{(+)}$ gekennzeichneten Substanzen sind bisher noch nicht beschrieben worden.

1.) 8-Brom-guanosin-2'(3')-phosphat.

Zu einer Lösung von Guanosin-2'(3')-phosphat (1.65 g, 4 mmol Di-Na-Salz) in 100 ml 0.2 M Acetatpuffer pH 4 wurde bei Raumtemperatur eine Bromlösung in Dioxan/Wasser (1 : 1 $^{v}/_{v}$)(1 g, 6 mmol) unter Rühren zugetropft und 30 min lang stehen gelassen. Zu dieser Lösung wurden 4 g Bleiacetat (10 mmol) in 50 ml Wasser gelöst (pH 4 - 5) unter Rühren zugegeben. Die resultierende Suspension wurde mit konz. Ammoniak auf pH 10 - 11 gebracht und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschliessend mit Wasser zentrifugierend neutral gewaschen, in Wasser aufgenommen, mit Essigsäure auf pH 4 - 5 angesäuert und Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung eingeengt und gleichzeitig von überschüssigem Schwefelwasserstoff befreit. Nach der Gefriertrocknung wurden 1 g an Rohprodukt erhalten (60 %). Rf(B): 0.16 und 0.32, Rf(A): 0.08, Re(C): 1.02 (gegen Up = 1.00). Das gelblich gefärbte Rohprodukt ist frei von Guanosin-2'(3')-phosphat und wurde ohne weitere Reinigung zu weiteren Reaktionen verwandt. UV-Daten : λ_{max}: 260 nm, λ_{min}: 222 nm (pH 1 bis 7), λ_{max}: 270 nm, λ_{min}: 232 nm (OH^-).

2.) 8-Brom-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

(1.) (250 mg, 0.56 mmol) wurden nach M. SMITH et al.[43] mit Dicyclohexylcarbodiimid in das entsprechende Cyclophosphat überführt. Nach chromatographischer Reinigung wurden 150 mg (60 %) an (2.) erhalten. Rf(A): 0.35, Rf(B):

o.o9, Re(C): o.75. Durch alkalische und saure Hydrolyse wurde (1.) erhalten.

3.) 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat.

(1.) (2.2 g, 4 mmol) und frisch geschmolzenes wasserfreies Natriumacetat (3.3 g, 4o mmol) wurden in loo ml Eisessig unter leichtem Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde in einem Paraffinbad, das vorher schon auf 13o - 14o°C erwärmt worden war 2.5 h lang unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit Wasser kodestilliert. Anschliessend wurde die wässrige Lösung mit Natronlauge auf pH 12.5 gebracht und bei Raumtemperatur über Nacht stehen lassen. Nach Neutralisation und Einengen des Gemisches wurde filtriert und das Filtrat an einer Sephadex G-lo Säule fraktionierend entsalzt. (83 x 3.8 cm, 36 ml/h) Die Fraktionen, die (3.) enthielten wurden gesammelt, eingeengt und gefriergetrocknet. Ausbeute 1.1 g (61 %). Rf(A): o.1, Rf(B): o.36 + o.5o, Re(C): 1.o5.
UV-Daten: λ_{max}: 248,294 nm, λ_{min}: 222,269 nm (pH 2), λ_{max}: 253,286 nm, λ_{min}: 228,266 nm (pH 8.5), λ_{max}: 258, 28o(sh)nm, λ_{min}: 23o nm (pH 12)

4.) 8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

(3.) (47o mg, 1.1 mmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (1loo mg, 5.5 mmol) wurden in einem Gemisch aus 2.5 ml 2 N-Ammoniak, 2.5 ml N,N-Dimethylformamid und lo ml t-Butanol gelöst und 2.5 h lang unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde das t-Butanol am Rotationsverdampfer bei 35°C entfernt und zu der verbleibenden Lösung 2o ml Wasser gegeben. Die Suspension wurde mit Äther ausgeschüttelt, filtriert und die wässrige Phase noch zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei 35° abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und chromatographiert. Ausbeute 3oo mg (75 %). Rf(A): o.26, Rf(B): o.24, Re(C): o.9o. UV-Daten : s.o. (3.).

5.) N^1-Methyl-8-Brom-guanosin.(+)

8-Brom-guanosin (362 mg, 1 mmol) wurden zu einer Suspension von 17o mg Kaliumcarbonat (1.2 mmol) in 3 ml Dimethylsulfoxid gegeben. Nach Zugabe von o.o7 ml Methyljodid wurde

das Gemisch zwei Stunden lang im verschlossenen Kolben bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde anschliessend über Celite filtriert und das Filtrat tropfenweise in 5o ml Methylenchlorid eingerührt. Der entstandene Niederschlag wurde aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 23o mg (6o %). Rf(E): o.33, Rf(A): o.62, Rf(B): o.11, Re(C): o.58. UV-Daten: λ_{max}: 262 nm (pH 2 - 13).

6.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin.(+)

(5.) (5oo mg, 1.3 mmol) und frisch geschmolzenes Natriumacetat (13oo mg) wurden unter leichtem Erwärmen in 4o ml Eisessig gelöst. Die resultierende Lösung wurde in einem Paraffinbad, das vorher auf 13o bis 14o°C erwärmt worden war 2.5 h lang bei dieser Temperatur unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel abgedampft, dreimal bis zur Entfernung der Essigsäure mit Äthanol kodestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, über Celite filtriert und das Filtrat über Sephadex G-1o fraktionierend entsalzt(83 x 3.8 cm, 36 ml/h). Fraktion 48 bis 6o wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 175 mg (44 %). Rf(A): o.47, Rf(F): o.45. UV-Daten : λ_{max}: 249,292 nm, λ_{min}: 228,27o nm (pH 2 - 9), λ_{max}: 261, 3oonm, λ_{min}: 232,284nm (pH 11).

7.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphit.(+)

Zu einer Lösung von (6.) (175 mg, o.56 mmol) in 5 ml N,N-Dimethylformamid wurden 2.5 ml Triäthylphosphit und o.5 ml HCl/DMF gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend mit 6o ml o.4 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer versetzt und das Lösungsmittel bei 3o°C abgedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und über eine Sephadex G-1o Säule (3.8 x 83 cm, 36 ml/h) getrennt. Fraktion 2o bis 37 gesammelt, das Eluat eingeengt und papierchromatographisch gereinigt. Ausbeute: 17o mg (78 %). Rf(A): o.47. UV-Daten: s. o. (6.).

8.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.(+)

17o mg (7.) (o.43 mmol) und 2 ml Hexachloroaceton wurden in 4 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen. Nach Zugabe von 5o ml Triäthyl

ammoniumbicarbonat-Puffer wurde die entstandene Emulsion eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt, dreimal mit 25 ml Äther ausgeschüttelt, die wässrige Phase über Celite filtriert und das Filtrat bei 3o°C in Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und über eine Sephadex G-1o Säule (1.8 x 93 cm, 12 ml/h) entsalzt. Fraktion 18 bis 34 wurde gesammelt, eingeengt und papierchromatographisch gereinigt. Ausbeute: 5o mg (28 %). Daneben entstand bei der Aufarbeitung noch 13 mg N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat. Rf(A): o.37, Rf(B): o.3o, Re(C): o.66. N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat : Rf(A): o.12, Rf(B): o.3o + o.43, Re(C): o.87. UV-Daten: s. o. (6.).

9.) 7-(N-Cyclohexyl,N'-morpholiniummethyl-äthyl)-carbamidino-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.(+)

(4.) (1oo mg, o.28 mmol) und 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (95o mg, 2 mmol) wurden in 4 ml Wasser suspendiert und auf pH 8.5 gebracht. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1-N-HCl mit Hilfe des pH-stat-Titrators während der Reaktion konstant gehalten. Nach Zugabe von Ammoniumacetat wurde die Lösung eingeengt und über eine Sephadex-Glo Säule (83 x 3.8 cm 2o ml/h) entsalzt. Fraktion 38 bis 45 wurde gesammelt, eingeengt und chromatographisch gereinigt. Ausbeute: 15o mg (7o %) Rf(A): o.39., Re(C): o.53. UV-Daten : λ_{max}: 3oo nm λ_{min}: 27o nm.

1o.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.(+) 2. Methode.

(9.) (125 mg, o.17 mmol) wurden in 4 ml Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung auf pH 9.5 eingestellt und portionsweise Dimethylsulfat (1.2 mmol) zugetropft. Während der Reaktion wurde der pH-Wert mit Hilfe des Titrators konstant gehalten. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die Lösung eingeengt, der Rückstand in konz. Ammoniak gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Lösung wurde anschliessend eingeengt, mit Wasser kodestilliert und der Rückstand in Wasser gelöst und über eine Dowex 5o Kationenaustauschersäule gegeben (Pyridinium-Form). Das Eluat wurde eingeengt, mit Wasser mehrfach kodestilliert und pa-

pierchromatographisch gereinigt. Als Hauptmenge konnten 24 mg an (lo.) erhalten werden, das in seinen Eigenschaften sich nicht von (8.) unterscheiden liess. Daneben konnten noch N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat als Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden. In Spuren konnten nachgewiesen werden : 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat, der entsprecnende cyclische Diester und N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat.

11.) N^1-Methyl-8-oxo-guanosin-2'3'-cyclophosphat$^{(+)}$.

3. Methode.

(4.) (4o mg, o.1 mmol) wurden in 2 ml Wasser gelöst und die Lösung auf pH 8.6 eingestellt. Dimethylsulfat (16.5 microliter, o.15 mmol) wurden zur Lösung gegeben und der pH-Wert während der Reaktion durch Zugabe von 1-N-NaOH konstant gehalten. Anschliessend wurde die Lösung neutralisiert, eingeengt und chromatographiert. Ausbeute : 6 mg (18 %). Rf(A): o.34. Das Produkt war nicht von (8.) und (lo.) zu unterscheiden.

12.) N^7-Methyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat$^{(+)}$.

(4.) (43 mg, o.1 mmol) wurden in 1.5 ml Wasser gelöst und bei Raumtemperatur bei pH 8.6 mit Dimethylsulfat (16.5 microliter, o.15 mmol) versetzt. Der pH-Wert wurde während der Reaktion durch Zugabe von 1-N-NaOH konstant gehalten. Anschliessend wurde neutralisiert, die Lösung eingeengt, und chromatographiert. Ausbeute : 4 mg (12 %). Rf(A): o.29. Re(C): o.9o. UV-Daten: λ_{max}: 248,297 nm, λ_{min}: 227,271 nm (pH 2.o), λ_{max}: 249,287 nm, λ_{min}: 227,271 nm (pH 8.6) λ_{max}: 25o,278 nm, λ_{min}: 235,269 nm (pH lo.6).

13.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin$^{(+)}$.

1. Methode.

Zu einer Lösung von 25 mg 8-Oxo-guanosin (o.o8 mmol) in 2ml Methanol/Wasser (1 : 1 v/v) wurde unter Rühren und Eiskühlung eine ätherische Diazomethan-Lösung (2o ml, aus 17oo mg N-Nitroso-N-Methyl-Harnstoff) zugegeben, das Lösungsmittel anschliessend abgedampft und der Rückstand chromatographiert. Ausbeute: 15 mg (6o %). Rf(A) o.65, Re(C): o.65. UV-Daten: λ_{max}: 251,293 nm, λ_{min}: 229, 272 nm (pH 2 - 13)

14.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin$^{(+)}$.

2. Methode.

Zu einer Lösung von 4oo mg 8-Oxo-guanosin (1.3 mmol) in 5 ml N,N-Dimethylformamid wurden 2 ml N,N-Dimethylformamid-dimethyl-acetal gegeben und die Lösung 48 h lang auf llo°C gehalten. Anschliessend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit N,N-Dimethylformamid kodestilliert und der Rückstand in Dioxan/Wasser (1 : 1 v/v) unter Zugabe von Trockeneis aufgenommen. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand in Methanol suspendiert und mit Äther gefällt, der Niederschlag abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute : 22o mg (5o %). Rf(A) : o.65 Re(C) : o.63. UV-Daten : λ_{max}: 251,293 nm, λ_{min}: 229,272 nm (pH 2 - 12.5).

15.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin$^{(+)}$.

3. Methode.

N^1-Methyl-8-oxo-guanosin (6.) (ca. lo mg) wurde in einem ml Wasser gelöst und bei pH 9.4 mit einem Tropfen Dimethylsulfat methyliert. Durch Zugabe von o.1 N-NaOH wurde der pH-Wert der Lösung während der Reaktion konstant gehalten. Die Lösung wurde anschliessend eingeengt, neutralisiert und chromatographiert. Rf(A) : o.65, Re(C) : o.63. UV-Daten: λ_{max}: 25o, 294 nm, λ_{min}: 23o, 272 nm (pH 1 - 13).

16.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin$^{(+)}$.

4. Methode.

Eine Spatelspitze N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat wurde bei pH 4.8 2o h lang mit saurer Phosphatase inkubiert. Die Lösung wurde chromatographiert. Rf(A) : o.64. UV-Daten:λ_{max}: 25o,293 nm, λ_{min}: 23o,272 nm (pH 1 -12.5)

17.) N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat$^{(+)}$.

8-Oxo-guanosin-2':3'-cyclophosphat (4.) (13o mg, o.33 mmol) wurden in 2o ml Wasser gelöst und bei pH 8.6 mit Dimethylsulfat (o.3 ml, 3 mmol) portionsweise mit Hilfe des Titrators bei konstantem pH-Wert methyliert. Das Lösungsmittel wurde nach der Neutalisation eingeengt und der Rückstand chromatographiert. Ausbeute : 12o mg (91 %). Rf(A) : o.5o, Rf(B) : o.12, Re(C) : o.73. UV-Daten : λ_{max}: 25o,293 nm, λ_{min}: 23o,271 nm (pH 2 - 13)

Das bei der Aufarbeitung entstandene N^1,N^7-Dimethyl-8-oxo-guanosin-2'(3')-phosphat besitzt folgende Rf-Werte: Rf(A): o.22, Rf(B): o.2o + o.3o, Re(C): o.87.

18.) N^1-Methyl-8-methoxy-guanosin(+).

N^1-Methyl-8-brom-guanosin (5.) (21o mg, o.56 mmol) wurde 17 h lang in einer Lösung von 5o mg Natrium in 5 ml Methanol unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde mit Essigsäure neutralisiert und nach dem Einengen die Lösung auf eine Sephadex G-1o Säule zum Entsalzen gegeben (1.8 x 9o cm, 14 ml/h). Fraktion 29 bis 39 wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Ausbeute 11o mg (6o %). Rf(A): o.64, Re(C): o.61. UV-Daten: λ_{max}: 25o,281 nm, λ_{min}: 222, 269 nm (pH 2 - 13).

19.) 8-Thio-guanosin.[11]

Eine Lösung von 8-Brom-guanosin (11oo mg, 3 mmol) und Thioharnstoff (456 mg, 6 mmol) wurde 5 h lang unter Rühren am Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde filtriert und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute : 67o mg (71 %). Rf(A): o.28, Re(C): o.76. UV-Daten : λ_{max}: 23o,285,3o2 nm, λ_{min}: 217,248,294 nm (pH 1), λ_{max}: 291 nm, λ_{min}: 244 nm (pH 11).

2o.) 8-Thiomethyl-guanosin.[11]

Zu einer Mischung aus (19.) (5oo mg, 1.6 mmol) und 24o mg Kaliumcarbonat in 7.5 ml N,N-Dimethylformamid wurden o.17 ml Dimethylsulfat gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden lang auf 7o bis 75 °C erwärmt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung in 1oo ml Aceton gegossen und mit Essigsäure neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde aus Wasser umkristallisiert und getrocknet. Ausbeute : 3oo mg (58 %). Rf(A) o.36, Re(C): o.83. UV-Daten : λ_{max}: 272, 289(sh)nm, λ_{min}: 243 nm, (pH 1), λ_{max}: 285 nm λ_{min}: 243 nm (pH 11).

21.) 8-Thiomethyl-guanosin-5'-O-p-anisyldiphenylmethyläther(+)

Eine Lösung von (2o.) (284 mg, o.86 mmol) und 47o mg p-Anisyldiphenylmethylchlorid in 5 ml wasserfreiem Pyridin wurde 48 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand

in 8o ml Essigester aufgenommen und mit 2o ml Wasser ausgeschüttelt, zentrifugiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und chromatographiert. Ausbeute 51o mg (95 %). Rf(A): o.82. UV-Daten: λ_{max}: 276nm (Methanol), λ_{min}: 282 nm (Methylat).

22.) 8-Thiomethyl-guanosin-2'(3')-phosphat.
(21.) (5oo mg, o.85 mmol) und 2 ml beta-Cyanoäthylphosphat (2mmol in Pyridin/Wasser) wurden mit 2o ml wasserfreiem Pyridin zur Trockne eingeengt und der Rückstand noch zweimal mit wasserfreiem Pyridin kodestilliert. Schliesslich wurde der Sirup in 1o ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen, 167o mg Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und unter Feuchtigkeitsausschluss 48 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde 1 ml Wasser zur Lösung gegeben und 1 Stunde lang stehen lassen und der ausgefallene Harnstoff abfiltriert, mit Pyridin/Wasser (9 : 1 v/v) gewaschen, das Filtrat eingeengt und zweimal mit Wasser kodestilliert. Der Rückstand wurde bei Raumtemperatur drei Stunden lang mit 8o %iger Essigsäure hydrolysiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Kodestillieren mit Wasser wurde der Rückstand 4 Stunden lang bei 55°C mit 5o ml 3 N-Ammoniak hydrolysiert. Nach Filtration wurde das Filtrat eingeengt und chromatographiert. Ausbeute 112 mg (32 %) Rf(A): o.14, Re(C) o.92. (UV-Daten: s. o. 2o.)

23.) 8-Thiomethyl-guanosin-2':3'-cyclophosphat.
Eine Lösung von (22.) (112 mg, o.26 mmol) und 65o mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (1.5 mmol) wurde 4 Stunden lang mit Hilfe des Titrators auf pH 5.7 gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend über eine Dowex 5o Ionenaustauschersäule (Ammonium-Form) gegeben und das Eluat nach dem Einengen chromatographiert. Ausbeute: 73 mg (69 %). Rf(A): o.38, Re(C): o.75. UV-Daten : s. o. (2o.).

24.) 9-(beta-D-ribofuranosyl)-2-amino-6-hydrazino-Purin.
Zu einer Lösung von 6-Thioguanosin (Zellstoffwerke Waldhof) (7.7g 25 mmol) in 1oo ml o.5 N-NaOH wurden 2.35 ml Dimethylsulfat gegeben und das Gemisch 3o min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Neutralisation mit Essigsäure wurde zur

Trockne eingeengt und der Rückstand mit 5o ml Hydrazin (4o %ig) drei Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde anschliessend eingeengt, dreimal mit Wasser kodestilliert und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 5.5g, Rf(D): o.44.

25.) 2-Amino-adenosin

Eine Lösung von(24.) (5 g 17 mmol) in 2oo ml Wasser wurde mit 25 ml Raney-Nickel eine Stunde lang unter Rückfluss gekocht. Die noch heisse Suspension wurde über Celite filtriert und mit heissem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingeengt und der Rückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 2.5 g (5o %). Rf(A): o.31, Rf(F): o.51.

26.) Iso-guanosin.

(25.) (2 g, 6.7 mmol) und 3oo mg Natriumnitrit (6.7 mmol) wurden in 35 ml Wasser in der Wärme gelöst. Nach dem Abkühlen auf 5o° wurden drei ml Eisessig zur Lösung gegeben und fünf Minuten bei dieser Temperatur einwirken lassen. Die Reaktion wurde durch Verdünnen mit loo ml Wasser gestoppt. Das Gemisch wurde eingeengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen, mit Aceton/Äther versetzt, den Niederschlag abfiltriert, mit Äther gewaschen und anschliessend getrocknet. Ausbeute: 2g. Rf(D): o.25, Rf(F): o.58, Re(C): o.59. UV-Daten: λ_{max}: 233,28o nm, λ_{min}: 25o nm (pH 2.o) λ_{max}: 247,292 nm, λ_{min}: 264 nm (pH 5.6), λ_{max}: 251,283 nm, λ_{min}: 263 nm (pH 11)

27.) Iso-guanosin-2'(3')-phosphit (+).

Iso-guanosin (26.) (1 g, 3.5 mmol) und 4 ml Triäthylphosphit wurden in 8 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und mit HCl/DMF angesäuert und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Hydrolyse mit o.4 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer engte man die Lösung ein und nahm den Rückstand in Wasser auf. Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte an einer DEAE-Cellulose-Säule (Bicarbonat-Form). Nicht umgesetztes Nucleosid wurde mit Wasser eluiert. (27.) wurde mit o.2 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer eluiert und das Eluat eingeengt, mit Äthanol kodestilliert und getrocknet. Rf(D): o.18.

28.) Iso-guanosin-2':3'-cyclophosphat(+).

Eine Lösung von (27.) und 5 ml Hexachloroaceton in 1o ml N,N-Dimethylformamid wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschliessend mit 6o ml o.4 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer hydrolysiert und eine Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Die resultierende Emulsion wurde dreimal mit 5o ml Äther extrahiert, die wässrige Phase eingeengt, mit Wasser kodestilliert und über eine DEAE-Cellulose-Säule (Bicarbonat-Form) mit o.2 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer fraktionierend eluiert. Das Eluat wurde eingeengt, mit Wasser kodestilliert und (28.) mit Äthanol/Aceton/Äther ausgefällt und nach dem Zentrifugieren über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute an Triäthylammoniumsalz : 43o mg (3o % in bezug auf (26.)). Rf(A): o.26, Rf(B): o.22, Re(C): o.83. Iso-guanosin-2'(3')-phosphat: Rf(A): o.o5, Rf(B): o.38 + o.48, Re(C): o.94.

29.) N^3-Harnsäureribosid.

Zu 5 l frischem Rinderblut wurden zur Vermeidung der Gerinnung 5o g " Fibrisol " gegeben und anschliessend 3o min lang bei 3ooo U/min zentrifugiert. Die Erythrocyten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung zentrifugierend gewaschen. Zur Hämolyse erwärmte man die rote Masse mit 3 l Aceton und o.5 l Wasser auf dem Wasserbad bis der ausgefallene Niederschlag dunkelbraun wurde. Man gab zur Suspension noch ein Liter Wasser, liess erkalten, filtrierte über Celite, und engte das Filtrat auf 5oo ml ein. Nach wiederholtem Filtrieren über Celite wurde die Lösung mit Ammoniak auf pH 8 eingestellt, auf eine Dowex 1 x 2 Anionenaustauschersäule (Formiat-Form) gegeben und die Säule anfangs mit 1 Liter o.6 N-Ammoniumformiat-Lösung pH 8, dann mit 2 l Wasser und schliesslich mit o.ol N-Ameisensäure solange gewaschen, bis die Extinktion des Eluats bei 26o nm unter o.1 OD gesunken war. Die Elution des Ribosids erfolgte mit o.o4 N Ameisensäure. Die Fraktionen mit einem Extinktionsquotienten $E_{28o}/E_{26o} \geq 3.6$ wurden gesammelt und gefriergetrocknet. Ausbeute : 26o mg. Rf(A): o.34, Re(C): o.9o. UV-Daten: λ_{max}: 233,288nm, λ_{min}: 22o,256 nm (pH 1), λ_{max}: 298nm, λ_{min}: 257nm (pH 7), λ_{max}: 297nm, λ_{min}: 254nm (pH 14).

3o.) N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat.
(29.) (22o mg, o.66 mmol) wurden mit 2.5 ml Triäthylphosphit und o.15 ml HCl/DMF in 5 ml N,N-Dimethylformamid 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Man hydrolysierte anschliessend mit Triäthylammoniumbicarbonat und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Die wässrige Lösung des Rückstandes wurde über Sephadex G-1o entsalzt und der Phosphorigsäure-Ester papierchromatographisch gereinigt. Dieser wurde in 2.5 ml Hexachloroaceton und 5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach der unter (8.) beschriebenen Aufarbeitung erhielt man nach zusätzlicher papierchromatographischer Reinigung 3o mg des Ammoniumsalzes. (11 %). Rf(A): o.2b, Rf(B): o.23, Re(C): o.98. UV-Daten: s.o. (29.). N^3-Harnsäure-ribosid-2'(3')-phosphat : Rf(A): o.o7, Rf(B): o.39 + o.5o, Re(C): 1.o8.

31.) N^1,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäureribosid$^{(+)}$.
(29.) (3oo mg, 1 mmol) und 3 ml N,N-Dimethylformamid-dimethyl-acetal wurden in 1o ml N,N-Dimethylformamid suspendiert und 3 Stunden lang auf 11o°C erwärmt. Die resultierende Lösung wurde zur Trockne im Vakuum eingeengt und mit N,N-Dimethylformamid kodestilliert. Der Rückstand wurde in Metnanol suspendiert, der Niederschlag abfiltriert, mit Methanol gewascnen und getrocknet. Ausbeute: 175 mg. Die Mutterlauge wurde chromatographiert und ergab weitere 25 mg. (insgesamt 6o %). Rf(A): o.72, Re(C): o.7o. UV-Daten: λ_{max}: 235,291nm, λ_{min}: 228,26o nm (pH 2-12)

32.) N^1,N^7-Dimethyl-N^3-Harnsäureribosid-2':3'-cyclophosphat$^{(+)}$.
Die Darstellung von (32.) erfolgte nach der unter (7.) und (8.) beschrieben Methode. Ansatz: 175 mg (31.) (o.53 mmol), 2 ml Triäthylphosphit, 4 ml N,N-Dimethylformamid und o.15 ml HCl/DMF. Ausbeute: loo mg (46 %). Rf(A): o.47 für den Phosphorigsäure-Ester. Rf(A): o.41, Rf(B): o.24, Re(C): o.75. Daneben entstanden noch 47 mg an 2'(3')-Phosphorsäuremonoester. Rf(A): o.16, Rf(B): o.4o, Re(C): o.93.

33.) N^9-Harnsäureribosid-2'(3')-phosphat.
Unter Eiskühlung wurden 4.5 mg Natriumnitrit in 1.3 ml

Wasser zu einer Lösung von 5o mg 8-Oxo-guanosin-2'(3')-phosphat (o.12 mmol) in 2 ml 2-N-Schwefelsäure tropfenweise während 15 min unter Rühren zugegeben. Die Reaktion wurde nach 2o min durch Verdünnen mit 1oo ml Wasser gestoppt. Man neutralisierte die Lösung mit Bariumhydroxid und erwärmte 3o min lang unter Rühren auf 6o°C. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, das Zentrifugat eingeengt und über eine Dowex 5o Kationenaustauschersäule (Ammonium-Form, o.8 x 12 cm) gegeben. Das Eluat wurde eingeengt und chromatographiert. Ausbeute: 12 mg (25 %). Rf(A): o.13 Rf(B): o.38 + o.5o. Re(C): 1.o8. UV-Daten: λ_{max}: 236,288nm, λ_{min}: 26o nm (pH 2.55), λ_{max}: 236,293nm, λ_{min}: 265nm (pH 5.5), λ_{max}: 245,298nm, λ_{min}: 27onm (pH 11.35).

34.) 8-Brom-Adenosin-2'(3')-phosphat .

Adenosin-2'(3')-phosphat (3.5 g, 1o mmol) wurden in 1oo ml o.1 N-NaOH gelöst und o.6 ml Brom in 1o ml Dioxan/Wasser zu der Lösung getropft und über Nacht stehen lassen. Zu dieser Lösung gab man 7 g Bleiacetat in verdünnter Essigsäure und zentrifugierte nach Zugabe von konz. Ammoniak den Niederschlag ab. Der Rückstand wurde mit Wasser zentrifugierend neutral gewaschen und in die Suspension unter Rühren Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Nach Filtration wurde das Filtrat eingeengt, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und mit Aceton gefällt und der Niederschlag getrocknet. Ausbeute: 7oo mg (2o %). Rf(A): o.16, Rf(B): o.17 + o.26, Re(C): o.94. UV-Daten : λ_{max}: 263nm, λ_{min}: 231 nm (pH 5.5).

35.) 8-Oxo-adenosin-2'(3')-phosphat$^{(+)}$.

Eine Lösung von (34.) (6oo mg, 1.4 mmol) und 8oo mg Natriumacetat (1o mmol) in 2o ml Acetanhydrid wurde 1.5 Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 2o ml Äthanol wurde das Lösungsmittel nach einer halben Stunde abgedampft und dreimal mit Äthanol kodestilliert. Der Rückstand wurde in konz. Ammoniak gelöst und 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abdampfen des Ammoniaks gab man das Gemisch zur Entsalzung auf eine Sephadex G-1o Säule (3.8 x 83 cm , 2o ml/h) sammelte die entsprechenden Fraktionen und rechromatographierte sie. Aus-

beute: 120 mg (25 %). Rf(A): 0.08, Rf(B): 0.17 + 0.27. UV-Daten : λ_{max}: 268,289(sh)nm, λ_{min}: 235nm (pH 2), λ_{max}: 270nm, λ_{min}: 235nm (pH 7), λ_{max}: 280nm, λ_{min}: 235nm (pH 10.5).

36.) 8-Oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat(+).

Zu einer Lösung von (35.) (10 mg, 0.25 mmol) in 4 ml Wasser gab man 700 mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (1.5 mmol) und hielt den pH-Wert während der Reaktion konstant auf pH 5.8. Die Lösung wurde anschliessend über eine Dowex 50 Kationenaustauschersäule (Ammonium-Form, 0.8 x 12 cm) gegeben und das Eluat eingeengt und chromatographiert. Ausbeute : 47 mg (40 %). Rf(A): 0.35, Rf(B): 0.11, Re(C): 0.86. UV-Daten: s. o. (35.).

37.) N^7-Methyl-8-oxo-adenosin-2':3'-cyclophosphat(+).

25 mg (36.) (0.08 mmol) in 1.5 ml Wasser wurden bei pH 8.25 mit 0.05 ml Dimethylsulfat methyliert. Während der Reaktion wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 N-NaOH konstant gehalten. Das Lösungsmittel wurde eingeengt und der Rückstand chromatographiert. Ausbeute: 9 mg (30 %). Rf(A): 0.47, Re(C): 0.71. UV-Daten : λ_{max}: 268,289(sh)nm λ_{min}: 234nm (pH 1.8), λ_{max}: 271 nm (pH 6.0).

38.) Benzimidazolon-quecksilberchlorid(+).

Zu einer Lösung von 13.4 g Benzimidazolon-(2) (0.1 M) und 4 g NaOH (0.1 M) in 100 ml Wasser wurde eine Lösung von 27g Quecksilber-(II)-chlorid in 300 ml Äthanol unter Rühren zugegeben, Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser chloridfrei gewaschen und anschliessend mit Äthanol und Äther trockengewaschen und bei 60°C im Vakuum über Silicagel getrocknet. Ausbeute: 18 g (50 %).

39.) 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-beta-D-ribofuranose.

100 g (0.35 M) Guanosin wurden in 1.5 l wasserfreiem Pyridin suspendiert und auf 70 ± 2° erwärmt. Unter Rühren tropfte man 240 g (1.0 M) frisch destilliertes Benzoylchlorid mit solcher Geschwindigkeit zu, dass sich die Reaktion bei dieser Temperatur ohne äussere Wärmezufuhr von selbst erhielt. Man liess unter Rühren erkalten und filtrierte vom ausgefallenen Pyridiniumchlorid ab. Das überschüssige

Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2.5 l Methylenchlorid gelöst. Diese Lösung wurde nacheinander mit Wasser, 1-N-Schwefelsäure, gesättigter Natriumbicarbonatlösung und wieder mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde nach dem Trocknen über Natriumsulfat eingeengt und der Rückstand in 1 Liter Eisessig und o.5 l Acetanhydrid gelöst und 12 Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde abgedampft, der sirupöse Rückstand dreimal mit Äthanol kodestilliert, mit Aktivkohle verrieben und drei Tage lang im Soxhlet mit Äther extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde aus Alkohol und anschliessend aus Äther umkristallisiert. Ausbeute 12o g (67 %) Fp: 13o°C. UV-Daten: λ_{max}: 266 (sh), 274,28o.5 nm, λ_{min}: 259, 279.5 nm (Methanol).

4o.) 1-Chloro-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranose.

1o.8 g (o.o2 M) (39.) wurden in 25o ml absolutem Äther gelöst und trockener Chlorwasserstoff unter Eiskühlung bis zur Sättigung eingeleitet. Die Lösung wurde im verschlossenen Kolben 4 Tage lang im Eisschrank aufbewahrt. Anschliessend wurde der Äther abgedampft und der Rückstand dreimal mit wasserfreiem Toluol kodestilliert. Der sirupöse Rückstand wurde sofort weiter verarbeitet. Die Identifizierung erfolgte durch Reaktion mit Benzylalkohol zum kristallinen 1-O-benzyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-beta-D-Ribofuranosid. Fp: 87 - 88° C.

41.) N^1-beta-D-ribofuranosyl-Benzimidazolon-(2).

Zu einer azeotrop getrockneten Suspension von Benzimidazolon-quecksilberchlorid (7.36 g, o.o2 M) in 1oo ml absolutem Xylol wurde eine Lösung von (4o.) (2o mmol) in 5o ml wasserfreiem Toluol unter Rühren und Erwärmen auf 13o°C zugetropft. Fünf Minuten nach beendeter Zugabe wurden 13.6 g Quecksilber-(II)-bromid in einer Portion zugegeben und zwei Stunden lang weiter unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde unter Feuchtigkeitsausschluss filtriert und die Lösung eingeengt und wieder filtriert. Der Rückstand wurde in 5oo ml Petroläther eingerührt und der plastische Niederschlag in Chloroform gelöst, dreimal mit 3o %iger Kaliumjodid-Lösung und anschliessend dreimal mit Wasser extrahiert. Die organi-

sche Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde 36 Stunden lang in bei 0° mit Ammoniak gesättigtem Methanol hydrolysiert, das Lösungsmittel abgedampft, mit Wasser kodestilliert und schliesslich über Sephadex-G-1o gereinigt und mit Äthanol/Äther gefällt. Ausbeute: 85o mg (16 %). Rf(A): o.7o, Re(C): o.72. UV-Daten: λ_{max}: 278.5nm,283.5(sh)nm, λ_{min}: 248 nm (Methanol).

42.) N^1-beta-D-ribofuranosyl-Benzimidazolon-(2)-2'(3')-phosphit(+).

Die Darstellung erfolgte nach der unter (7.) beschriebenen Methode. Ansatz: 266 mg (1 mmol) (41.), 2ml Triäthylphosphit, 4 ml N,N-Dimethylformamid, o,2 ml HCl/DMF. Ausbeute: 13o mg (39 %). Rf(A): o.6o. UV-Daten: s. o. (41.).

43.) N^1-beta-D-ribofuranosyl-Benzimidazolon-(2)-2':3'-cyclophosphat(+).

(42.) (35 mg, o.1 mmol) wurden mit 2 ml Hexachloroaceton in 4 ml DMF versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Hydrolyse mit Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer und Extraktion mit Äther wurde die wässrige Phase eingeengt und chromatographiert. Ausbeute: 16 mg (46 %). Rf(A): o.42. N^1-beta-D-ribofuranosyl-Benzimidazolon-(2)-2'(3')-phosphat : Rf(A): o.12. UV-Daten: s. o. (41.).

44.) 5-Nitro-uridin-5'-O-p-Anisyldiphenylmethyläther(+).

Eine Lösung von 5-Nitro-uridin (15o mg, o.5 mmol) und 23o mg p-Anisyldiphenylmethylchlorid in 4 ml wasserfreiem Pyridin wurde 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen lassen. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand in Essigsäure aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand in wenig Äthanol aufgenommen und unter Rühren in Petroläther eingetropft. Der Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2oo mg (42 %). Rf(A): o.74.

45.) 5-Nitro-uridin-2'(3')-phosphat(+)

Die Darstellung erfolgte nach der unter (22.) beschriebenen Methode. Ansatz: 2oo mg an (44.)(o.35 mmol),

1 ml beta-Cyanoäthylphosphat (1 mmol), 835 mg Dicyclohexylcarbodiimid (4 mmol) in 5 ml Pyridin. Nach Chromatographie erhielt man 6o mg an (45.)(3o % , Ammoniumsalz). Rf(A): o.12, Rf(B): o.42 + o.66, Re(C): 1.14. UV-Daten : λ_{max}: 238, 3o5nm, λ_{min}: 262 nm, λ_{max}: 323nm, λ_{min}: 268 nm.

46.) 5-Nitro-uridin-2':3'-cyclophosphat(+).

Eine Lösung von (45.) (5o mg, o.18 mmol) in o.5 ml Tri-n-butylamin und Chlorameisensäureäthylester wurde 1o min lang heftig geschüttelt..Nach Zugabe von weiteren o.1 ml Chlorameisensäureäthylester wurden weitere 15 min geschüttelt. Die Lösung gab man über eine Dowex 5o Kationenaustauschersäule und engte das Eluat ein. Nach Chromatographie erhielt man 24 mg (45 %) an (46.). Rf(A): o.25. UV-Daten: s. o. (45.).

47.) N^3-Hydroxyäthyl-uridin(+) 139).

Eine Lösung von Uridin (1ooo mg, 4.1 mmol) in 4 ml N,N-Dimethylformamid und 2 ml N,N-Dimethylformamid-äthylenacetal wurde 16 Stunden lang auf 11o°C erwärmt. Das Lösungsmittel wurde anschliessend im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit Dioxan/Wasser unter Zugabe von Trockeneis versetzt. Die Lösung wurde eingeengt und chromatographiert. Ausbeute: 7o % (3o.ooo OD). Rf(D): o.68. UV-Daten : λ_{max}: 261 nm, λ_{min}: 233 nm (pH 1 - 13) Re(C): o.66.

48.) N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2'(3')-phosphit(+) 139).

(47.) (288 mg, 1 mmol) und 2.5 ml Triäthylphosphit wurden in 5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst , mit o.1 ml HCl/DMF versetzt und 48 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen lassen. Man dampfte nach der Hydrolyse mit Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer das Lösungsmittel ab, nahm den Rückstand in Wasser auf, filtrierte über Celite und gab das Filtrat auf eine DEAE-Sellulose-Säule. Bei der Elution mit Wasser erhielt man nicht umgesetztes Nucleosid. Bei Elution mit o.2 M Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer erhielt man (48.). Das Eluat wurde eingeengt, mit Wasser kodestilliert und im Vakuum getrocknet. Rf(A): o.54.

49.) N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-cyclophosphat(+) 139).

Zu dem Rückstand (48.) gab man 5 ml N,N-Dimethylformamid und 2.5 ml Hexachloroaceton und liess die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Nach der Hydrolyse mit Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt, die Emulsion dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Einengen der wässrigen Phase wurde das Reaktionsgemisch über eine DEAE-Cellulose-Säule greinigt. Ausbeute: 2o8 mg (54 %). Rf(A): o.54. UV-Daten: s. o. (47.).

5o.) N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-cyclophosphat(+)139).
2. Methode.

Eine Lösung von Uridin-2':3'-cyclophosphat (9oo mg, 2 mmol, Triäthylammonium-Salz) in 4 ml N,N-Dimethylformamid und 1.5 ml N,N-Dimethylformamid-äthylen-acetal wurde 2o Stunden lang auf llo°C erwärmt. Nach der unter (47.) beschriebenen Aufarbeitung und anschliessender Chromatographie wurden 9o mg (25 %, Ammonium-Salz) an (5o.) erhalten. Rf(A): o.54. UV-Daten: s. o. (47.).

51.) N^3-Hydroxyäthyl-uridin-2':3'-isopropyliden(+)139).

Eine Lösung von Uridin-2':3'-isopropyliden (2oo mg, o.7 mmol) in 2.5 ml N,N-Dimethylformamid und 1 ml N,N-Dimethylformamid-äthylen-acetal wurde 6 Stunden lang auf llo°C erwärmt. Nach der unter (47.) beschriebenen Aufarbeitung wurde der Rückstand auf einer Silicagel-Dickschichtplatte mit Äthylacetat chromatographiert. Ausbeute: 166 mg (72 %) Rf(D): o.87. UV-Daten: s.o. (47.).

52.) Reaktion von Guanosin-derivaten mit Phenylglyoxal.

1 mg des jeweiligen Guanosin-derivates wurde in o.1 ml Phosphatpuffer (o.o5 M) pH 8.2 gelöst. Die Hälfte dieser Lösung wurde mit o.o5 ml einer 3 %igen Phenylglyoxallösung in o.o5 M Phosphatpuffer pH 8,2 mit lo % Methanolgehalt versetzt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach drei Stunden wurde in Fliessmittel F chromatographiert. Als Test dienten die nur in Phosphatpuffer gelösten Ausgangsverbindungen.

53.) Cytidin-2'-O-methyl-3'-phosphat(+).

4 mg an Cytidylyl-2'-O-methyl-(3'-5')-Cytidin aus RNA-Hydrolysat [140] und 20 mg Natriumperjodat wurden in 1 ml Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 min wurden 20 mg Natriumcarbonat zugegeben und zwei Stunden lang weiter gerührt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und der Überstand mit Essigsäure neutralisiert und chromatographiert. R(f) 0.17.

F.) Literaturverzeichnis.

1) G.Schmidt, R.Cubiles, N.Zöllner, L.Hecht, N.Strickler, K.Seraidarian, M.Seraidarian, S.J.Tannhauser, J. Biol. Chem. 192. 715 (1951).
2) H.Witzel, Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. (Edited by T.N.Davidson and W.E.Cohn) Academic Press, New York, Vol. II. S. 221.
3) H.G.Gassen, H.Witzel, European J. Biochem. 1. 36 (1967).
4) H.G.Mandel, R.Markham, R.E.F.Matthews, Biochim. Biophys. Acta 24. 2o5 (1957).
5) H.Witzel, Ann. 635. 191 (196o).
6) D.Findlay, D.G.Herries, A.P.Mathias, B.R.Rabin, C.A.Ross, Biochem. J. 85. 152 (1962).
7) B.R.Rabin, A.P.Mathias, Mechanismen enzymatischer Reaktionen, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Göttingen, S. 97 (1964).
8) A.Deavin, A.P.Mathias, B.R.Rabin, Nature 211. 252 (1966).
9) A.Deavin, A.P.Mathias, B.R.Rabin, Biochem. J. lol. 14 (1966).
lo) E.N.Ramsden, K.J.Laidler, Can. J. Chem. 44. 2597 (1966).
11) H.Follmann, H.J.Wieker, H.Witzel, European J. Biochem. 1. 243 (1967).
12) J.P.Hummel, D.A.VerPloeg, C.A.Nelson, J. Biol. Chem. 236. 3786 (1961).
13) D.Findlay, D.G.Herries, A.P.Mathias, B.R.Rabin, Nature 19o. 781 (1961).
14) M.Irie, J. Biochem. (Tokyo) 64. 347 (1968).
15) D.G.Anderson, G.G.Hammes, F.G.Waltz,Jr., Biochem. 7. 1637 (1968).
16) M.Irie, F.Sawada, J. Biochem. (Tokyo) 62. 282 (1967).
17) H.H.Rüterjans, H.Witzel, European J. Biochem. in Vorbereitung.
18) D.H.Meadows, O.Jardetzky, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. in Vorbereitung.
19) A.Holý, F.Šorm, Biochim. Biophys. Acta 161. 264 (1968).
2o) H.W.Wyckoff, K.Hardman, N.M.Allewell, T.Inagami, L.N. Johnson, F.M.Richards, J. Biol. Chem. 242. 3749 (1967).

21) H.N.Wyckoff, K.Hardman, N.M.Allewell, T.Inagami, L.N. Johnson, F.M.Richards, J. Biol. Chem. 242. 3984 (1967).
22) G.Kartha, J.Bello, D.Harker, Nature 213. 862 (1967).
23) A.Deavin, R.Fischer, C.M.Kemp, A.P.Mathias, B.R.Rabin, European J. Biochem. 7. 21 (1968).
24) C.A.Dekker, Ann. Rev. Biochem. 29. 453 (1960).
25) F.Cramer, H. Seidel, Biochim. Biophys. Acta, 72. 157 (1963).
26) F.Cramer, K.Randerath, E.A.Schäfer, Biochim. Biophys. Acta, 72. 150 (1963).
27) W.Szer, D.Shugar, Acta Biochim. Polon. 9. 131 (1962).
28) H.J.Wieker, Diplomarbeit, Marburg 1965.
29) N.W.Y.Ho, P.T.Gilham, Biochem. 6. 3632 (1967).
30) R.Naylor, N.W.Y.Ho, P.T.Gilham, J. Am. Chem. Soc. 87. 4207 (1965).
31) B.E.Griffin, Lord Todd, A.Rich, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44. 1123 (1958).
32) A.Holý, H. Witzel, unveröffentlicht.
33) F.J.F.Dippy, Chem Rev. 25. 151 (1939).
34) F.J.F.Dippy, S.R.C.Hughes, J.W.Laxton, J. Chem. Soc. 1470(1954).
35) J.Eggert, L.Hock, G.M.Schwab, Physikalische Chemie, 8. Auflage 1960, Hirzel Verlag Stuttgart S. 367.
36) R.E.Holmes, R.K.Robins, J. Am. Chem. Soc. 87. 1772 (1965).
37) M.Ikehara, K.Muneyama, J. Org. Chem. 32. 3039 (1967).
38) M.Ikehara, K.Murao, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 16. 1330 (1968).
39) R.Markham, J.D.Smith, Biochem J. 49. 401 (1951).
40) R.Markham, J.D.Smith, Biochem J. 52. 552 (1952).
41) C.S.Hanes, F.A.Isherwood, Nature 164. 1107 (1949).
42) D.M.Brown, D.I.Magrath, A.R.Todd, J. Chem. Soc. 2708 (1952).
43) M.Smith, J.G.Moffatt, H.G.Khorana, J. Am. Chem. Soc. 80. 6204 (1958).
44) T.Ukita, K.Waku, M.Irie, O.Hoshino, J. Biochem. (Tokyo) 50. 405 (1961).
45) B. Weissmann, P.A.Bromberg, A.B.Gutman, J. Biol. Chem. 224. 407 (1957).
46) D.Shugar, J.J.Fox, Biochim. Biophys. Acta, 9 .199 (1955).
47) J.A.Haines, C.B.Reese, Lord Todd, J. Chem. Soc 5281 (1962).
48) H.Bredereck, Chem. Ber. 80. 401 (1947).

49) J.Žemlička, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 28. 1o6o (1963).
5o) A.D.Broom, L.B.Townsend, J.F.Jones, R.K.Robins, Biochem. 3. 494 (1964).
51) A.Holý, J.Smrt, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 31. 1528 (1966).
52) B.Weissmann, P.A.Bromberg, A.B.Gutman, J. Biol. Chem. 224. 423 (1957).
53) I.J.Borwitz, S.M.Bloom, J.Rothschild, D.B.Sprinson, Biochem. 4. 65o.(1965).
54) B.Weissmann, A.B.Gutman, J. Biol. Chem. 229. 239 (1957).
55) K.Nakaya, O.Takemaka, H.Horinishi, K.Shibata, Biochim. Biophys. Acta, 168. 23 (1968).
56) M.Staehelin, Biochim. Biophys. Acta, 31. 448 (1959).
57) N.K.Kochetkov, E.I.Budowsky, N.E.Broude, L.M.Klebanova, Biochim. Biophys. Acta, 134. 493 (1967).
58) R.Shapiro, J.Hachmann, Biochem. 5. 2799 (1966).
59) R.Shapiro, B.I.Cohen, S.J.Shiney, H.Maurer, Biochem. 8. 238 (1969).
6o) K.Takahashi, J. Biol. Chem. 243. 6171 (1968).
61) P.Brooks, P.D.Lawley, J. Chem. Soc. 539 (196o).
62) J.B.Macon, R.Wolfenden, Biochem. 7. 3453 (1968).
63) M.Ikehara, H.Tada, M.Kaneko, Tetrahedron 24. 3489 (1968).
64) M.Ikehara, S.Uesugi, M.Kaneko, Chem. Commun. 17 (1967).
65) E.J.Eyring, J.Ofengand, Biochem. 6. 25oo (1967).
66) R.Haselkorn, P.Doty, J. Biol. Chem. 236. 2738 (1961).
67) M.Staehelin, Experientia 15. 413 (1959).
68) R.E.Cline, R.M.Fink, K.J.Fink, J. Am. Chem. Soc. 81. 2521 (1959).
69) F.Bergmann, S.Dikstein, J. Am. Chem. Soc. 77. 691 (1955).
7o) B.R.Rabin, C.Cuchillo, C.Kemp, A.P.Mathias, Abstracts of Commun., 6th Meeting of the FEBS, Madrid 7-11th April 1969, Abs. No. 33.
71) I.Wempen, I.L.Doerr, L.Kaplan, J.J.Fox, J. Am. Chem. Soc. 82. 1614 (196o).
72) G.M.Tener, J. Am. Chem. Soc. 83. 159 (1961).
73) A.M.Michelson, J. Chem. Soc. 3665 (1959).
74) H.S.Forrest, D.Hatfield, J.M.Lagowski, J. Chem. Soc. 963 (1961).

75) G.Revankar, L.B.Townsend, J. Heterocyclic Chem. 5. 477 (1968). CA 7o. 11596n (1969)
76) J.Davoll, B.A.Lowy, J. Am. Chem. Soc. 73. 165o (1951).
77) J.J.Fox, N.Yung, J.Davoll, G.W.Brown, J. Am. Chem. Soc. 78. 2117 (1956).
78) G.Wagner, Z. Chemie 6. 367 (1966).
79) G.Wagner, H.Pischel, Naturwissenschaften, 48. 454 (1961).
8o) B.R.Baker, J.P.Joseph, R.E.Schaub, J.H.Williams, J. Org. Chem. 19. 1786 (1954).
81) J.A.Montgomery, K.Hewson, Chem. Commun. 16 (1969).
82) E.Walton, F.W.Holly, G.E.Boxer, R.F.Nutt, J. Org. Chem. 31. 1163 (1966).
83) M.Prystaš, F.Šorm, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 33. 21o (1968).
84) G.E.Hilbert, T.B.Johnson, J. Am. Chem. Soc. 52. 2ool (193o).
85) L.Birkofer, A.Ritter, H.P.Kühltau, Chem. Ber. 93. 281o (196o).
86) L.Birkofer, A.Ritter, H.P.Kühltau, Chem. Ber. 97. 934 (1964).
87) T.Ukita, R.Funakoshi, Y.Hirose, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 12. 828 (1964).
88) H.M.Kissman, C.Pidacks, B.R.Baker, J. Am. Chem. Soc. 77. 18 (1955).
89) L.S Efros, A.V. El'tsov, J. Gen. Chem. (USSR) 27. 755 (1957).
9o) F.Reisser, W.Pfleiderer, Chem. Ber. 99. 547 (1966).
91) H.Zinner, K.Peseke, Chem. Ber. 98. 35o8, 3513 (1965).
92) A.M.Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press, London and New York, S.323 (1963).
93) A.M.Michelson, J. Chem. Soc. 979 (1962).
94) H.J.Wieker, Dissertation, Marburg 1966
95) B.Magasanik, E.Chargaff, Biochim. Biophys. Acta, 7. 396 (1951).
96) D.B.Wetlaufer, J.T.Edsall, B.R.Hollingworth, J. Biol. Chem. 233. 1421 (1958).
97) L.B.Clark, I.Tinoco, Jr., J. Am. Chem. Soc. 87. 11 (1965).
98) J.J.Fox, D.Shugar, Biochim. Biophys. Acta, 9. 369 (1952).
99) H.M.Rauen, Biochem. Taschenbuch, Bd. I, S. 593, Springer

Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.(1964).
100) N.C.Yung, J.H.Burchenal, R.Fecher, R.Dushinsky, J.J. Fox, J. Am. Chem. Soc. 83. 4060 (1961).
101) M.Roberts, D.W.Visser, J. Am. Chem. Soc. 74. 668 (1952).
102) D.Lipkin, F.B.Haward, D.Novotny, M.Sano, J. Biol. Chem. 238. PC2249 (1963).
103 R.Shapiro, R.W.Chambers, J. Am. Chem. Soc. 83. 3920 (1961).
104) K.H.Scheit, Chem. Ber. 101. 1141 (1968).
105) H.G.Gassen, Dissertation,Marburg 1965.
106) M.Winkley, R.K.Robins, J. Org. Chem. 33. 2822 (1968).
107) A.M. Michelson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 37. 396 (1951).
108) F.Šorm, J.Farkaš, J.Beránek, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 31. 4002 (1966).
109) W.Szer, D.Shugar, Acta Biochim. Polon. 13. 177 (1966).
110) H.Pischel, A.Holý, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 33. 2066 (1968).
111) G.H.Beaven, E.R.Holiday, E.A.Johnson, The Nucleic Acids, (Edited by E.Chargaff and J.N.Davidson) Academic Press, Vol. I. S. 508, (1955).
112) E.Burrows, G.Shaw, J. Chem. Soc. 1088 (1967).
113) Berechnungen von J.Czikkely, Phys.-Chem.-Inst.
114) S.Angyal, Angew. Chemie 81. 172 (1969).
115) Ch. Jardetzky, J. Am. Chem. Soc. 84. 62 (1962).
116) Ch.Jardetzky,O.Jardetzky, J. Am. Chem. Soc. 82. 222 (1960).
117) Ch.Jardetzky, J. Am. Chem. Soc. 82. 229 (1960).
118) M.Sundaralingam, J. Am. Chem. Soc. 87. 599 (1965).
119) J.Donohue, K.N.Trueblood, J. Mol. Biol. 2. 263 (1960).
120) T.L.V.Ulbricht, J.P.Jennings, P.M.Scopes, W.Klyne, Tetrahedron Letters 695 (1964).
121) J.T.Yang, T.Samejima, J. Am. Chem. Soc. 85. 4039 (1963).
122) W.A.Klee, S.H.Mudd, Biochem. 6. 988 (1967).
123) T.L.V.Ulbricht, T.R.Emerson,R.J.Swan, Tetrahedron Letters 1561 (1966).
124) J.A.Schellman, Accounts Chem. Res. 1. 144 (1968).
125) T.R.Emerson, R.J.Swan, T.L.V.Ulbricht, Biochem. 6. 843 (1966).

126) D.W.Miles, M.J.Robins, R.K.Robins, M.W.Winkley, H.J. Eyring, J. Am. Chem. Soc. 91. 831 (1969).
127) M.P.Schweizer, A.D.Broom, P.O.P.Ts'o, D.P.Hollis, J. Am. Chem. Soc. 9o. 1o42 (1968).
128) D.W.Miles, M.J.Robins, R.K.Robins, M.W.Winkley,H.J. Eyring, J. Am. Chem. Soc. 91. 824 (1969).
129) J.R.Fresco, Tetrahedron 13. 185 (1961).
13o) H.S.Loring, N.G.Luthy, J. Am. Chem. Soc. 73. 4215 (1951).
131) A.M.Michelson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 37. 396 (1951).
132) O.Schindler, Helv. Chim. Acta. 32. 979 (1949).
133) S. Beychock, Science 154. 1288 (1966).
134) M.Ikehara, M.Kaneko, K.Muneyama, H.Tanaka, Tetrahedron Letters 3977 (1967).
135) M.Ikehara, M.Kaneko, J. Am. Chem. Soc. 9o. 497 (1968).
136) M.Ikehara, M.Kaneko, M.Sagai, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 16. 1151 (1968).
137) J.Davoll, J. Am. Chem. Soc. 73. 3174 (1951).
138) H.J.Vieker, H.Witzel, European J. Biochem. 1. 251 (1967).
139) R.Bald, A.Holý, Collection Czechoslov. Chem. Commun. in Vorbereitung.
14o) K.Dimroth, H.Witzel, Ann. 62o. 1o9 (1959).

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel,

danke ich für die Anleitung und sehr wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Der Dr. Carl Duisberg-Stiftung, Bohmerhof, danke ich für ein Stipendium.

Der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, danke ich für einen Studienaufenthalt am Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prag.

Herrn Dr. A. Holý, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Prag, danke ich für die Überlassung von Nucleosid-phosphaten für die differenzspektroskopischen Messungen.

Lebenslauf

Am 19. Februar 1943 wurde ich als Sohn des Buchdruckers Wilhelm August Bald und dessen Ehefrau Gertrud, geborene Schmidt, in Siegen/Westf. geboren. Mein Vater fiel als Wehrmachtsangehöriger am 1. Februar 1944 bei Sitno (Ukraine). Nach dem Besuch der Volksschule in Siegen von 1949 bis 1953 besuchte ich die Amtsrealschule in Eiserfeld/Sieg, die ich Ostern 1959 mit dem Zeugnis der mittleren Reife verliess. Ostern 1959 trat ich in die Untersekunda des staatlichen Aufbaugymnasiums in Hilchenbach (Kreis Siegen) ein. 1963 bestand ich dort die Reifeprüfung. Seit dem Sommersemester 1963 studiere ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Im Wintersemester 1963/64 begann ich mit dem Chemiestudium. Das Vordiplom bestand ich im Mai 1965 und das mündliche Hauptdiplom im Februar 1967. Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel beschäftigte ich mich während meiner Diplom- und Doktorarbeit mit biochemischen Problemen, vor allem auf dem Gebiet der Nucleinsäure-Chemie.

Meine akademischen Lehrer waren :

Aurich, Balli, Dimroth, Drawert, Hellner, Henssen, Huckriede, Jacobshagen, Karlson, Kating, Kellner, Kirmse, Körner, Kuhn, Leschik, Mahr, Musso, Nöth, Pfeil, Reichardt, Rickert, Schäfer, Schmid, Schmidbaur, M. Schmidt, No. Schmidt, Seelig, Seidel, v. Stosch, Walcher, Witzel.